

## 明 細 書

## 癌転移阻害剤

## 技術分野

本発明は、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor; 以下、IGF と表記する) -I および IGF-II の活性を阻害する物質を有効成分として含有する癌転移阻害剤に関する。

## 背景技術

癌の転移とは、癌細胞が体中に広がって再増殖することである。患者を死に至らしめる最大の原因は癌転移である。原発部位にとどまる癌は、外科的手術によって比較的簡単に取り除くことができる。しかし、さまざまな部位に転移した癌を外科的手術によって取り除くことは難しい (日経サイエンス 1996 年 12 月号 p 30)。

癌の転移は特定の臓器に発生しやすい。骨は、肺、肝臓と並んで癌の遠隔転移の主な標的臓器である。特に、前立腺癌、乳癌、肺癌、多発性骨髄腫の患者では、骨に高率に転移する。骨に転移した癌に対して、従来の癌治療法ではほとんど効果が得られず、患者は強い肉体的苦痛および精神的不安に苛まれ、その結果、生活の質 (Quality of life) は著しく損なわれる (Nature Reviews Cancer, 2, 584-593, 2002、実験医学 16、149-155、1998)。従って、骨転移を治療するための有用な治療方法が求められている。また、肝臓への転移は消化器癌、特に進行大腸癌で高率に発生するため、肝臓への転移は大腸癌の予後を不良にする大きな要因である。従って、肝転移を治療するために有用な治療法が求められている。

癌の骨転移のメカニズムについては、いまだ不明の点が多い。重要なメカニズムの一つとして、骨に豊富に含まれているさまざまな増殖因子が癌細胞の骨転移を促進する可能性が指摘されている。骨に貯蔵されている増殖因子とその貯蔵量 (ng/g 乾燥骨重量) は、次の通りである [IGF-II : 1300-1700ng/g、トランスフォーミング  $\beta$  増殖因子 (TGF  $\beta$ ) : 400-460ng/g、IGF-I : 85-170ng/g、血小板由

Best Available Copy

来増殖因子 (PDGF) : 50-70ng/g、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) : 40-80ng/g、酸性繊維芽細胞増殖因子 (aFGF) : 0.5-12ng/g、骨形態原性蛋白質 (BMP) : 1-2ng/g、アクチビン : 1ng/g (実験医学 16、149-155、1998) ]。癌細胞自身は骨を破壊することができない。しかしながら、破骨細胞で骨が破壊された後、骨に貯蔵されている上記増殖因子が遊離されて、癌細胞の増殖が促進される可能性が指摘されている。

また、癌の肝転移のメカニズムについても、いまだ不明の点が多い。消化器癌の血行性転移の場合には、原発巣から血流中に遊離した癌細胞は、まず肝臓に到達し、毛細血管床に捕らえられることが多いとの解剖学的な理由から、消化器癌は肝転移しやすいとの可能性が指摘されている。

IGF と癌の転移の関連性についても、報告がある。IGF-I の受容体 (以下、IGF-IR と表記する) のドミナントネガティブ体をヒト大腸癌細胞株に発現すると、マウスでの肝転移が抑制されることが報告されている (Laboratory Investigation、82、1377-1389、2002)。また、IGF-IR ドミナントネガティブ体をヒト乳癌細胞株に発現すると、マウスでの肺、肝、リンパ節への転移が抑制されることが報告されている (Cancer Research、58、3353-3361、1998)。ルイス肺癌の亜株である H-59 は肝臓に高転移性を示す腫瘍細胞株であるが、肝臓細胞の培養上清に含まれる H-59 の増殖を促進する因子を解析した結果、IGF-I が H-59 の増殖促進活性を示すことが報告されている。ルイス肺癌の別の亜株で肺のみに転移する M-27 は IGF-I による増殖促進活性を持たないことから、癌細胞の肝臓への転移には IGF-I が関与していることが報告されている (Cancer Research、54、3732-3737、1994)。

実際、IGF-IR に対するアンチセンス RNA を発現させることで、高転移性のヒト乳癌細胞のマウスでの造腫瘍性および肺への転移性が低下し、生存期間の延長が認められること (Cancer Gene Therapy、7、384-395、2000)、抗 IGF-IR 抗体により、マウスに移植されたヒト横紋筋肉腫細胞やヒト乳癌細胞の増殖が抑制されること (Cancer Research、54、5531-5534、1994; Journal of Clinical Investigation、84、1418-1423、1989; Breast Cancer Research & Treatment、22、101-106、1992)、など IGF 作用の抑制による抗腫瘍効果が報告されている

(*Biochimica et Biophysica Acta*, 1332, F105-F126, 1997)。その一方で、抗 IGF-IR 抗体は、マウスに移植されたエストロゲン非依存性増殖を示すヒト乳癌細胞の生着を抑制するものの、エストロゲン依存性増殖を示すヒト乳癌細胞の生着や生着したヒト乳癌細胞の増殖を抑制できないことが示されており、IGF-IR の作用阻害のみでは、十分な抗腫瘍効果が得られないことも示唆されている (*Breast Cancer Research & Treatment*, 22, 101-106, 1992)。

IGF に対する抗体、すなわち抗 IGF 抗体としては、既にいくつかの抗体が知られている。代表的なヒト IGF-I に対する抗体 (抗 hIGF-I 抗体) としては、sm1.2 が報告されている (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 2389-2392, 1984)。sm1.2 は、hIGF-II と 40% 程度の交差反応性を有していること、1~2  $\mu$ g/mL の濃度でウェスタンブロッティング法により、100ng の hIGF-I を検出可能であること、10~30  $\mu$ g/mL の濃度で 20ng/mL の hIGF-I によるマウス繊維芽細胞株 BALB/c3T3 の増殖を阻害すること、が明らかとなっている (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 2389-2392, 1984; *Journal of Clinical Investigation*, 99, 2961-2970, 1997)。

その他、抗 hIGF-I 抗体としては、Val<sup>59</sup>-SmC121 があり、該抗体は、ヒトインスリンおよび hIGF-II とは反応しないこと、hIGF-I の 10~12 番目の Leu-Val-Asp を含むペプチドを認識すること、<sup>125</sup>I-hIGF-I を用いたラジオイムノアッセイでは、1ng/mL の hIGF-I の検出感度を示したことが報告されている (*Journal of Endocrinology*, 125, 327-335, 1990)。41/81 は、hIGF-II とは 3% の反応性を有しており、また、<sup>125</sup>I-hIGF-I を用いたラジオイムノアッセイでは、1ng/mL の hIGF-I の検出感度を示す (*FEBS Letters*, 149, 109-112, 1982)。35I17 は、hIGF-II と 0.5% 程度の交差反応性を有していること、1  $\mu$ g/mL の濃度でのウェスタンブロッティング法により、1  $\mu$ g の hIGF-I を検出可能であること、12  $\mu$ g/mL 以上の濃度で hIGF-I によるマウス繊維芽細胞株 BALB/c3T3 の増殖を完全に阻害すること、30  $\mu$ g/mL の濃度で 1  $\mu$ g/mL の hIGF-I による hIGF-IR の自己リン酸化を阻害すること、また、<sup>125</sup>I-hIGF-I を用いたラジオイムノアッセイでは、0.1nM の hIGF-I の検出感度を示すことが報告されている (*Hybridoma*, 16, 513-518,

1997)。BPL-M23 は、hIGF-I に対して 10.5 litres/nmol の結合活性を示し、一方、hIGF-II およびヒトインスリンには、それぞれ 0.8% および 0.0001% の交差反応性を示すこと、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウサギの IGF とは反応性を示すが、ラットおよびマウスの IGF とは反応しないこと、ラット脂肪細胞に対する hIGF-I による脂肪形成を抑制することが報告されている (Journal of Molecular Endocrinology, 2, 201-206, 1989)。7A1、1B3、4C1、5A7 は、hIGF-I の C および D ドメインの異なるエピトープを認識すること、hIGF-II とはそれぞれ 6.6%、0.83%、12%、1.2% の交差反応性を示すことが報告されている (Hybridoma, 12, 737-744, 1993)。3D1/2/1 は、ヒトおよびモルモットの IGF-I とは反応を示すが、ウサギ、ラット、マウスの IGF-I とは反応しないこと、hIGF-II とは、7% の交差反応性を示すことが報告されている (Journal of Clinical and Metabolism, 54, 474-476, 1982)。

代表的なヒト IGF-II に対する抗体 (抗 hIGF-II 抗体) としては、S1F2 が報告されている。S1F2 は、hIGF-I と 10% 程度の交差反応性を有していること、 $1\mu\text{g/mL}$  の濃度でのウェスタンブロッティング法により、 $10\sim 100\text{ng}$  の hIGF-II を検出可能であること、 $100\mu\text{g/mL}$  の濃度で  $100\text{ng/mL}$  の hIGF-II によるヒト繊維芽細胞の DNA 合成促進作用を阻害することが明らかとなっている (Diabetes Research and Clinical Practice, 7, S21-S27, 1989; Endocrinology, 124, 870-877, 1989)。2H11、2B11、ID5、ID9 は、hIGF-II と反応し、hIGF-I とは反応しないこと、競合酵素免疫測定法 (以下、ELISA と表記する) により、 $1\text{ng/mL}$  の hIGF-II を定量可能であることが報告されている (特開平 5-252987 号)。しかしながら、これらの抗体が癌転移の阻害に有用であることは知られていない。

従って、本発明の課題は、癌の転移阻害剤、特に癌の骨転移および肝転移を抑制するために有用な薬剤を提供することにある。

#### 発明の開示

即ち、本発明は、以下の (1)～(4) の発明を包含する。

- (1) インスリン様成長因子-I (IGF-I) およびインスリン様成長因子-II (IGF-II) の活性を阻害する物質を有効成分として含有する癌転移阻害剤。

(2) 物質が、以下の (a) ~ (e) からなる群より選ばれる、(1)に記載の阻害剤。

(a) IGF-I および IGF-II に特異的に結合し、IGF-I および IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片

(b) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を含む組成物

(c) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を組み合わせる組成物

(d) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片の複合体

(e) 上記 (a) ~ (d) のいずれか他分子を結合させた複合体

(3) 抗体がモノクローナル抗体である、(2)に記載の阻害剤。

(4) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体 (scFv)、二量体化可変領域 (Diabody)、ジスルフィド安定化可変領域 (dsFv) および CDR を含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である、(2)または(3)に記載の阻害剤。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ヒト前立腺癌細胞 MDA PCa 2b の増殖に対する抗体 KM1468 による増殖阻害活性を示す。横軸は添加サンプルの種類と濃度を、縦軸は細胞増殖を示す。

第2図Aは、初期転移モデルにおける抗体 KM1468 の前立腺癌の骨転移阻害活性、第2図Cは、進行転移モデルにおける抗体 KM1468 の前立腺癌の骨転移阻害活性をそれぞれ示す。第2図Bは、初期転移モデルにおける抗体 KM1468 の添加および非添加時の血清中 PSA 濃度、第2図Dは、進行転移モデルにおける抗体 KM1468 の添加および非添加時の血清中 PSA 濃度をそれぞれ示す。

第3図は、ヒト多発性骨髄腫細胞 RPMI8226 に対する hIGF-I 刺激による IGF-IR、Akt および MAPK のリン酸化、ならびに抗体 KM1468、抗体 KM1762 によるリン

酸化抑制をウェスタンブロッティングにより検出した結果を示す。

第 4 図は、hIGF-I 刺激によるヒト多発性骨髄腫細胞 RPMI8226 増殖に対する抗体 KM1468 ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) による増殖阻害活性を示す。

第 5 図は、hIGF-I 刺激によるヒト多発性骨髄腫細胞 RPMI8226 増殖に対する種々の濃度の抗体 KM1468 による増殖阻害活性を示す。

第 6 図は、初期転移モデルにおける、抗体 KM1468 の多発性骨髄腫の骨への転移阻害活性を示す。

第 7 図は、初期転移モデルにおける、抗体 KM1468 の乳腺癌の骨への転移阻害活性を示す。

第 8 図は、大腸癌の肝臓への転移モデルにおいて、抗 IGF 抗体を投与したときの大腸癌細胞株の肝臓への転移の阻害活性を示す。各カラム内の横線は 4 分位置を示し、それぞれ上から 90、75、50、25、10%分値位置を表す。各カラムの○は各群における最大値および最小値を示す。

第 9 図は、大腸癌の肝臓への転移モデルにおいて、抗 IGF 抗体を投与したときの腫瘍切片における AI (apoptosis index) 値を示す。各カラム内の横線は 4 分位置を示し、それぞれ上から 90、75、50、25、10%分値位置を表す。各カラムの○は各群における最大値および最小値を示す。

第 10 図 A は、大腸癌の肝臓への転移モデルにおいて、抗 hIGF-I 抗体を投与したときの大腸癌細胞株の肝臓での転移病巣に対する治療効果を示す。各カラム内の横線は 4 分位置を示し、それぞれ上から 90、75、50、25、10%分値位置を表す。第 10 図 B は、大腸癌の肝臓への転移モデルにおいて、抗 hIGF-I 抗体を投与したときの延命効果を示す。横軸は投与開始後の経過日数を示し、縦軸は累積生存率を示す。実線は処置群を、破線は無処置群を示す。

第 11 図は、モノクローナル抗体の hIGF-I に対する特異的な反応性を示す (結合 ELISA)。横軸は、抗体と抗原の組み合わせを、縦軸は結合活性 (OD415) を示す。

第 12 図は、モノクローナル抗体の液相系における天然の立体構造を有する hIGF-I に対する反応性を示す (競合 ELISA)。横軸は添加した hIGF-I 濃度を、縦軸は結合活性 (OD415) を示す。

第 1 3 図は、抗体 KM1468 および sm1.2 の hIGF-I に対する反応を示す。横軸は抗体濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸は結合活性 (OD415) を示す。○は KM1468、□は sm1.2 の反応性をそれぞれ示す。

第 1 4 図は、抗体 KM1468 および sm1.2 の hIGF-I に対する結合における各種因子による阻害活性を示す。横軸は各種因子濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸は結合活性 (%) を示す。A は hIGF-I、B は hIGF-II、C はヒトインスリン、D は mIGF-I によるそれぞれの活性を示す。○は KM1468、□は sm1.2 の反応性をそれぞれ示す。

第 1 5 図は、抗体 KM1468、sm1.2 および S1F2 の hIGF およびヒトインスリンによるヒト乳癌細胞株 MCF7 の増殖に対する影響を示す。A は各因子による細胞増殖活性を示す。横軸は各種因子濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸は増殖 (OD450) を示す。○は hIGF-I、●は hIGF-II、□はヒトインスリンの活性をそれぞれ示す。B は hIGF-I、C は hIGF-II、D はヒトインスリンによる増殖活性に対する各種抗体の影響を示す。横軸は抗体濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸は増殖 (OD450) を示す。細点線は抗体非添加時の増殖を、点線は各因子非添加時の増殖を示す。○は KM1468、□は sm1.2、■は S1F2 の活性をそれぞれ示す。

第 1 6 図は、抗体 KM1468、sm1.2 および S1F2 の hIGF およびヒトインスリンによるヒト大腸癌細胞株 HT-29 の増殖に対する影響を示す。A は各因子による細胞増殖活性を示す。横軸は各種因子濃度 ( $\text{ng/mL}$ )、縦軸は増殖 (OD450) を示す。○は hIGF-I、●は hIGF-II、□はヒトインスリンの活性をそれぞれ示す。B は hIGF-I、C は hIGF-II、D はヒトインスリンによる増殖活性に対する各種抗体の影響を示す。横軸は抗体濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸は増殖 (OD450) を示す。細点線は抗体非添加時の増殖を、点線は各因子非添加時の増殖を示す。○は KM1468、□は sm1.2、■は S1F2 の活性をそれぞれ示す。

第 1 7 図は、抗体 KM1468、sm1.2 および S1F2 の hIGF およびヒトインスリンによるヒト骨肉腫細胞株 MG63 の増殖に対する影響を示す。A は各因子による細胞増殖活性を示す。横軸は各種因子濃度 ( $\text{ng/mL}$ )、縦軸は増殖 (OD450) を示す。○は hIGF-I、●は hIGF-II、□はヒトインスリンの活性をそれぞれ示す。B は hIGF-I、C は hIGF-II、D はヒトインスリンによる増殖活性に対する各種抗体の影響を示す。横軸は抗体濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸は増殖 (OD450) を示す。細点線

は抗体非添加時の増殖を、点線は各因子非添加時の増殖を示す。○は KM1468、□は sm1.2、■は S1F2 の活性をそれぞれ示す。

第 18 図は、抗体 KM1468 の hIGF-I に対する結合における各種ペプチドによる阻害活性を示す。横軸は各種ペプチド濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸は結合活性 (%) を示す。用いた各種ペプチドについては、図中に示した。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003 年 8 月 21 日に出願された日本国特許出願 2003-297871 号、および 2004 年 5 月 10 日に出願された日本国特許出願 2004-139707 号の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

#### A. 本発明の癌転移阻害剤の有効成分

本発明の癌転移阻害剤の有効成分は、IGF-I および IGF-II の活性を阻害する物質であればいかなるものでもよい。

IGF-I および IGF-II の活性を阻害する物質は、単一の物質であってもよく、複数の物質からなる組成物であってもよく、複数の物質からなる組成物の場合にはそれぞれの物質を同時にまた別々に使用してもよい。

IGF-I および IGF-II の活性を阻害する物質としては、

(a) IGF-I および IGF-II に特異的に結合し、IGF-I および IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片

(b) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を含む組成物

(c) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を組み合わせる組成物

(d) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片の複合体



(e) 上記 (a) ~ (d) のいずれかと他分子を結合させた複合体などがあげられる。

上記の「IGF-I および IGF-II の活性を阻害する」とは、IGF-I および IGF-II が有するいずれかの活性を阻害することをいうが、具体的には、IGF-I および IGF-II が有する細胞増殖促進活性を阻害することがあげられる。

本発明で使用される「IGF-I および IGF-II に特異的に結合し、IGF-I および IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片」とは、IGF-I と IGF-II の両方に特異的に結合し、かつ IGF-I と IGF-II の両方の活性を阻害する抗体または抗体断片をいう。具体的には、天然型 IGF-I および天然型 IGF-II に存在するエピトープを認識する抗体または抗体断片、IGF-I および IGF-II の立体構造を認識する抗体または抗体断片などがあげられる。

本発明で使用される上記の抗体または抗体断片は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれであってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。

また、上記の抗体または抗体断片には、「ヒト以外の動物の抗体」、「遺伝子組換え抗体」、それらの抗体断片なども含まれる。

ここで、「遺伝子組換え抗体」としては、ヒト化抗体、ヒト抗体などがあげられ、また、「ヒト化抗体」としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

「ヒト型キメラ抗体」とは、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL とヒト抗体の CH および CL とからなる抗体をいう。ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、さらに hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいずれのものでもよく、κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

また、ヒト以外の動物とは、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどをいう。

「ヒト型 CDR 移植抗体」とは、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を

ヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体をいう。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を任意のヒト抗体の VH および VL のフレームワーク（以下、FR と表記する）と連結した V 領域をコードする cDNA を設計、構築し、ヒト抗体の CH および CL をコードする cDNA を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、さらに hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいずれのものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは  $\lambda$  クラスのものを用いることができる。

「ヒト抗体」とは、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウイルスなどを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を単独で培養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、scFv などの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により 2 本の完全な H 鎖および 2 本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウス ES 細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該 ES 細胞をマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通

常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を生成蓄積させることができる。

本発明において好ましく使用できる抗体または抗体断片としては、ハイブリドーマ KM1468 (FERM BP-7978) が生産するモノクローナル抗体 KM1468、または、hIGF-I に反応し、約 40 %hIGF-II にも交差反応する抗 hIGF-I モノクローナル抗体 sm1.2 (Upstate Biology 社) などがあげられる。

「IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を含む組成物」としては、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片のいずれかと、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片のいずれかを含む組成物であればいかなるものでもよい。

ここで用いる「IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片」とは、IGF-I に特異的に結合するが、IGF-II に特異的に結合しない（交差反応性がない）抗体をいい、例えば、マウス IGF-1（以下 mIGF-I と表記する）に対する抗体である AF791 (R & D 社製)、ヒト IGF-I（以下 hIGF-I と表記する）に対するモノクローナル抗体である 56408 (R&D 社製)、M23/ILG1-001 (Biogenesis 社製) などがあげられる。

また、「IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片」とは、IGF-II に特異的に結合するが、IGF-I に特異的に結合しない（交差反応性がない）抗体をいい、例えば、mIGF-II に対する抗体である AF792 (R & D 社製)、hIGF-II に対するモノクローナル抗体である S1F2 (Upstate Biology 社製) などがあげられる。

また、「IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を組み合わせてなる組成物」とは、「IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片」を含む剤と、「IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片」を含む剤を別々に調製し、これらの剤を組み合わせて同時にまたは逐次的に用いるための組成物をいう。

「IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片の複合体」としては、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片のいずれかと、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片のいずれかとを結合させることにより得られる複合体であればいかなるものでもよい。

具体的には、上記の二種類の抗体または抗体断片を下記的手段で結合させた抗体複合体があげられる。

抗体の結合方法としては、化学的に結合させる方法、または蛋白質工学的手法を用いる方法があげられる。

化学的に結合させる方法としては、二種類の抗体分子を N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)-propionate や S-acetylmercaptosuccinic acid anhydride などの架橋剤を用いて結合する方法などがあげられる。

蛋白質工学的な手法を用いる結合方法としては、蛋白質工学的手法を用いて複数の抗体あるいは抗体断片を結合した形で発現させられる方法があれば、いかなる方法でも用いることができる。蛋白質工学的な手法と用いる結合方法で作製される抗体複合体としては、二種類の scFv を適当なリンカーを介して結合させた分子、二種類の抗体 Fab' 断片を適当なリンカーを介して結合させた分子、二種類の scFv を N 末端と C 末端に連結した Fc 融合蛋白質、二種類の scFv を連結した Fc 融合蛋白質のヘテロ分子、diabody、diabody が N 末端あるいは C 末端に連結した Fc 融合蛋白質などがあげられる。

上述した抗体のいずれかと他分子を結合させた複合体としては、IGF-I および IGF-II に特異的に結合し、IGF-I および IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片；IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を含む組成物；IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を組み合わせてなる組成物；IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片との複合体；のいずれかと少なくとも 1 種類の他

分子を結合させることにより得られる複合体であればいかなるものでもよい。

他分子としては、例えば放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の化合物、蛋白質などがあげられる。放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質などの他分子と上述の抗体との結合方法としては、いかなる方法でもよいが、好ましくは化学的に結合させる方法（抗体工学入門、金光修著、地人書館、1994）、蛋白質工学的手法を用いる結合方法などがあげられる。

化学的な結合方法としては、抗体または抗体断片のH鎖あるいはL鎖のN末端側あるいはC末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖などに上記の他分子を結合させる方法である。

蛋白質工学的手法を用いる結合方法としては、抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたい他分子、例えば蛋白質をコードするDNAを連結させて発現用ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させることにより抗体または抗体断片と他分子を結合させた融合体を製造する方法をあげることができる。

放射性同位元素としては、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ などがあげられ、例えば、クロラミンT法などにより抗体に結合させることができる。

低分子の薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤などの抗癌剤（臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社、1996）、またはハイドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤（炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社、1982）などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介

してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などがあげられる。

高分子の化合物としては、ポリエチレングリコール（以下、PEG と表記する）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどがあげられる。これらの高分子化合物を抗体または抗体断片に結合させることにより、（1）化学的、物理的あるいは生物学的な種々の因子に対する安定性の向上、（2）血中半減期の顕著な延長、（3）免疫原性の消失、抗体産生の抑制、などの効果が期待される（バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店、1993）。例えば、PEG と抗体を結合させる方法としては、PEG 化修飾試薬と反応させる方法などがあげられる（バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店、1993）。PEG 化修飾試薬としては、リジンの  $\epsilon$ -アミノ基の修飾剤（特開昭 61-178926）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基の修飾剤（特公昭 56-23587）、アルギニンのグアニジノ基の修飾剤（特開平 2-117920）などがあげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカイン、例えば、ヒトインターロイキン 2、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ヒトマクロファージコロニー刺激因子、ヒトインターロイキン 12 などがあげられる。また、癌細胞を直接障害する活性を有するリシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質と抗体を結合させた複合体については、抗体または抗体断片をコードする cDNA に蛋白質をコードする cDNA を連結させ、複合体をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、複合体を製造することができる。

本発明で使用する抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、diabody、dsFv および CDR を含むペプチドなどがあげられる。

Fab は、IgG 型抗体分子を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H 鎖の 224 番目のアミノ酸残基で切断される）、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗

体断片である。

本発明で使用する Fab は、抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

$F(ab')_2$  は、IgG 型抗体分子を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H 鎖の 234 番目のアミノ酸残基で切断される）、Fab がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明で使用する  $F(ab')_2$  は、抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記の Fab' をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab' は、上記  $F(ab')_2$  のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明で使用する Fab' は、 $F(ab')_2$  を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の Fab' 断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab' を製造することができる。

scFv は、1 本の VH と 1 本の VL とを適当なペプチドリンカー（以下、P と表記する）を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明で使用する scFv は、抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFv を製造することができる。

diabody は、scFv が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一とすることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。本発明で使用する diabody は、抗体の

VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA をリンカーのアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabody を製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で使用する dsFv は、抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFv を製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH または VL の CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリナーを介して結合させることができる。本発明で使用する CDR を含むペプチドは、抗体の VH および VL の CDR をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDR を含むペプチドを製造することができる。また、CDR を含むペプチドは、Fmoc 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法 (t-ブチルオキシカルボニル法) などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明で使用する抗体または抗体断片は、ELISA (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996)、IGF-I および IGF-II による細胞増殖に対する阻害活性 (Cancer Research, 48, 4083-4092, 1988) などを測定することにより、in vitro での IGF-I および IGF-II に対する結合活性、IGF-I および IGF-II の活性を阻害する



活性を評価することができる。

## B. 本発明の癌転移阻害剤の有効成分の作製

以下に、本発明で使用される抗体の一つである、IGF-I および IGF-II に特異的に結合し、かつ IGF-I および IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片の作製方法ならびに活性評価について記す。

### 1. IGF に対するヒト以外の動物のモノクローナル抗体の作製

#### (1) 抗原の調製

IGF をコードする cDNA を含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などに導入、発現させ、組換え型 IGF 蛋白質を得、これを抗原に用いることができる。あるいは、IGF 部分配列を有する合成ペプチドを抗原に用いることもできる。

抗原用部分ペプチドとしては、5～30 残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の該蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。立体構造上蛋白質表面に存在する部分は、ジェネティック・マック (Genetyx Mac) など市販の蛋白質配列解析ソフトを用い、親水性の高い部分配列を予測することで推測することができる。すなわち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多いためである。また、蛋白質の N 末端、C 末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を確立する抗原となるとは限らない。

部分ペプチドには蛋白質と架橋するために、システインを末端に付加する。蛋白質の内部配列を部分ペプチドとして選択した場合には、必要に応じペプチドの N 末端はアセチル化、C 末端はアミド化する。部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1, 1979; Vol. 2, 1980; Vol. 3, 1981, Academic Press; ペプチド合成の基礎と実験、丸善、1985; 続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、廣川書店、1991; International Journal of Peptide & Protein Research, 35,

161-214, 1990)。また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、Applied Biosystems, Inc. 社（以下、ABI 社と表記する）製ペプチド合成機、Advanced ChemTech Inc. 社（以下、ACT 社と表記する）製ペプチド合成機などの市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した  $N\alpha$ -Fmoc-アミノ酸あるいは  $N\alpha$ -Boc-アミノ酸などを用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。

原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI 社、島津製作所、国産化学（株）、Nova Biochem 社、渡辺化学（株）、ACT 社またはペプチド研究所（株）などから入手することができる。また、原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法に従って、あるいはそれに準じて合成することができる（The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1, 1979; Vol. 2, 1980; Vol. 3, 1981, Academic Press; ペプチド合成の基礎と実験、丸善、1985; 続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、廣川書店、1991; International Journal of Peptide & Protein Research, 35, 161-214, 1990)。

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

免疫に用いる動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものでもよい。下記に、マウスおよびラットを用いる例について説明する。

3～20 週令のマウスまたはラットに、上記 1 (1) で調製した抗原を免疫し、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に適当なアジュバントとともに抗原を数回投与することにより行う。アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント

(Complete Freund's Adjuvant) または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどがあげられる。また、ウシ血清アルブミン（以下、BSA と表記する）や Keyhole Limpet Hemocyanin（以下、KLH と表記する）などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いることができる。各抗原の投与後 3 ～7 日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、抗原として用いた hIGF に対する反応性を ELISA などで確認し、その血清が十分な抗体価

を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源とする。抗原の最終投与後 3 ～7 日目に、免疫したマウスまたはラットより公知の方法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) に準じて脾臓などを摘出し、抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合させる。

### (3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である 8-アザグアニン耐性骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) (European Journal of Immunology, 6, 511-519, 1976)、SP2/0-Ag14 (SP-2) (Nature, 276, 269-270, 1978)、P3-X63-Ag8653 (653) (Journal of Immunology, 123, 1548-1550, 1979)、P3-X63-Ag8 (X63) (Nature, 256, 495-497, 1975) など、*in vitro* で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) に従い、細胞融合時までに  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

### (4) 細胞融合

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングリコール-1000 (以下、PEG-1000 と表記する) などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁する。細胞の洗浄には Modified Eagle's Medium (以下、MEM と表記する) または Phosphate Buffered Saline (以下、PBS と表記する) などを用いる。また、融合細胞を懸濁する培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地 {通常培地 [RPMI-1640 培地に 1.5mM グルタミン、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、10  $\mu$ g/mL ジェンタマイシンおよび 10% 牛胎児血清 (以下、FBS と表記する) を加えた培地] に 0.1mM ヒポキサンチン、15  $\mu$ M チミジンおよび 0.4  $\mu$ M アミノプテリンを加えた培地} を用いる。

培養後、培養上清の一部を取り、ELISA により抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。次いで、限界希釈法により単一細胞化を行い、ELISA により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

## (5) ハイブリドーマの選択

抗 hIGF モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、公知の方法 (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) に従い、以下に述べる ELISA により行う。これらの方法により、後述する抗 hIGF キメラ抗体、抗 hIGF CDR 移植抗体またはそれらの抗体断片を産生する形質転換株の培養上清中に含まれる抗体あるいはすべての精製抗体の結合活性を測定することができる。

### ELISA

抗原を 96 穴 ELISA プレートに固定化し、ハイブリドーマなどの培養上清あるいは精製抗体を第一抗体として反応させる。第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。第二抗体としては、第一抗体を認識することができる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射性同位元素などで標識した抗体を用いる。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としてはマウス抗体を認識できる抗体を用いる。反応後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行ない、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして選択する。

当該ハイブリドーマの具体例としては、ハイブリドーマ KM1468 などがあげられる。ハイブリドーマ KM1468 は、2002 年 3 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 郵便番号 305-8566）にプタベスト条約の規定下で FERM BP-7978 として寄託されている。

## (6) モノクローナル抗体の精製

0.5mL のプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）を腹腔内投与し、2 週間飼育した 8~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、1 (4) で得られた抗 hIGF モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50% 飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE- セファロースカラム、プロテイン A-カラムあるいはセルロファイン GSL2000（生化学工業社製）のカラムなどを用い

て、IgG あるいは IgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質濃度は、ローリー法あるいは 280nm での吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのこと、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 があげられる。

#### (7) モノクローナル抗体の活性評価

##### (7-1) hIGF への結合活性評価

培養上清中あるいは精製した抗 hIGF モノクローナル抗体の hIGF に対する結合活性は、上記 1 (5) の ELISA および表面プラズモン共鳴 (Journal of Immunological Methods, 145, 229-240, 1991) などにより測定することができる。また、hIGF および hIGF の部分ペプチドを用いた競合 ELISA により、hIGF との反応性および抗原エпитープを解析することができる。抗体が hIGF の立体構造を認識しているか否かは、通常行われる立体構造的解析法、あるいは種々の免疫学的測定法を組み合わせることにより、推測することができる。立体構造解析法としては、例えば、X 線結晶解析、核磁気共鳴法などがあげられる。種々の免疫学的測定法を組み合わせる方法としては、例えば、非変性状態の抗原に対する ELISA 法と変性状態の抗原に対する ELISA 法を組み合わせる方法があげられる。このとき、非変性状態の抗原にのみ反応性を示す抗体は、抗原の立体構造を認識している可能性が高いものと推測できる。非変性状態の抗原に対する ELISA 法とは、液層中で非変性抗原と抗体を反応させる ELISA 法などがあげられる。変性状態の抗原に対する ELISA 法としては、抗原がもとの立体構造を保持していない状態で抗体を反応させる ELISA 法であればいずれでもよく、例えば、疎水性の反応プレート上に直接固定化した抗原や、適当な長さに消化した部分ペプチドなどに対する ELISA 法があげられる。

本発明の抗体は、該結合活性測定法または競合 ELISA により、hIGF-II に対する結合活性と hIGF-I に対する結合活性とを有する抗体を選択することにより取得することができる。

また、hIGF 依存的な増殖を示す細胞株に対する影響を検討することにより、in vitroにおける hIGF の活性を阻害する活性を測定することができる。hIGF-I または hIGF-II 依存的な増殖を示す細胞株としては、ヒト乳癌細胞株 MCF7 (ATCC HTB-22)、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 (ATCC HTB-38)、ヒト前立腺癌細胞株 MDA PCa 2b (ATCC CRL-2422)などがあげられる。

さらに、マウスなどの動物を用いて hIGF 依存的な細胞増殖測定系を確立し、該測定系に対する影響を検討することにより、in vivoにおける hIGF の活性を阻害する活性を測定することができる。

### (7-2) 癌転移阻害活性評価

癌転移阻害活性の評価方法としては、Yonou ら (Cancer Research, 61, 2177-2182, 2001) のヒト前立腺癌のヒト骨への転移評価系等を用いる方法があげられる。

## 2. IGF に対するヒト以外の動物のポリクローナル抗体の作製

ポリクローナル抗体は、上記 1. (2)に示された方法で免疫を施した動物のうち、その血清が十分な抗体価を示した動物の血清から調製することができる。

即ち、該動物から回収した血液から遠心分離法により分画した血清、あるいは該血清から常法に従って免疫グロブリン画分を精製し、ポリクローナル抗体を調製することができる。該ポリクローナル抗体の活性は、上記 1. (7)に記載の方法により、抗原に対する結合活性を評価することができる。

## 3. ヒト化抗体の作製

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとしては、ヒト抗体の CH および／または CL をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであればいかなるものでもよい。ヒト化抗体発現用ベクターは、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域は任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域（以下、hC $\gamma$ 1 と表記する）およびヒト抗体の L 鎖の  $\kappa$  クラスの C 領域（以下、hC $\kappa$  と表記する）などがあげられ

る。ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンからなる染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)、pAGE103 (Journal of Biochemistry, 101, 1307-1310, 1987)、pHSG274 (Gene, 27, 223-232, 1984)、pKCR (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78, 1527-1531, 1981)、pSG1 $\beta$ d2-4 (Cytotechnology, 4, 173-180, 1990) などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー

(Journal of Biochemistry, 101, 1307-1310, 1987)、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR プロモーターとエンハンサー (Biochemical & Biophysical Research Communications, 149, 960-968, 1987)、イムノグロブリン H 鎖のプロモーター (Cell, 41, 479-487, 1985) とエンハンサー (Cell, 33, 717-728, 1983) などがあげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖および L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい (Journal of Immunological Methods, 167, 271-278, 1994)。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (W097/10354)、pEE18 (Hybridoma, 17, 559-567, 1998) などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得およびアミノ酸配列の解析

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得する。

マウス抗体などを産生するハイブリドーマより mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージあるいはプラスミドなどのベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体の C 領域部分あるいは V 領域部分をプローブとして用い、VH をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドおよび VL をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなど、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマから全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 (Methods in Enzymology, 154, 3-28, 1987)、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) などがあげられる。また、ハイブリドーマから mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) などがあげられる。

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34)、あるいは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマから抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express (Stratagene, 5, 58-61, 1992)、pBluescript II SK(+) (Nucleic Acids Research, 17, 9494, 1989)、 $\lambda$  ZAP II (Stratagene 社製)、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11 (DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49, 1985)、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、



$\lambda$ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 (Molecular & Cellular Biology, 3, 280-289, 1983) および pUC18 (Gene, 33, 103-119, 1985) などのファージあるいはプラスミドベクターが用いられる。

ファージあるいはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' (Journal of Biotechnology, 23, 271-289, 1992)、C600 (Genetics, 59, 177-190, 1968)、Y1088、Y1090 (Science, 222, 778-782, 1983)、NM522 (Journal of Molecular Biology, 166, 1-19, 1983)、K802 (Journal of Molecular Biology, 16, 118-133, 1966) および JM105 (Gene, 38, 275-276, 1985) などが用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA クローンの選択法としては、放射性同位元素あるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはプラーク・ハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction (以下、PCR 法と表記する; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34) により VH および VL をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) などのプラスミドベクターにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、ジデオキシ法 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 5463-5467, 1977) などの反応を行い、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (ABI 社製) などを用いて解析することで該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から VH および VL の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological

Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することにより、取得した cDNA が分泌のためのシグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することにより、シグナル配列の長さおよび N 末端アミノ酸配列を推定でき、さらにはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH および VL の各 CDR のアミノ酸配列についても、既知の抗体の VH および VL のアミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することによって見出すことができる。

さらに、VH および VL の完全なアミノ酸配列を用いて任意のデータベース、例えば、SWISS-PROT や PIR-Protein などに対して BLAST 法 (Journal of Molecular Biology, 215, 403-410, 1990) などの配列の相同性検索を行い、配列の新規性を検討することができる。

### (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

上記 3 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の CH および CL の 5' 末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを上記 3 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。また、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を含むプラスミドを鋳型として、5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を有するプライマーを用いて PCR 法により VH および VL をコードする cDNA を増幅し、それぞれを上記 3 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH およ

び CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (4) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植するヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank などのデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性 (少なくとも 60% 以上) を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。次に、選択したヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮して塩基配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから、VH、VL とも 6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上記 3 (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 反応後、増幅産物を pBluescript SK(-)

(Stratagene 社製) などのプラスミドにクローニングし、上記 3 (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のア

ミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドを取得する。

(5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のみをヒト抗体の VH および VL の FR に移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている

(BIO/TECHNOLOGY, 9, 266-271, 1991)。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の VH および VL では、CDR のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基が CDR の移植に伴い、ヒト抗体の VH および VL の FR の異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基や CDR のアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266-271, 1991)。ヒト型 CDR 移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために X 線結晶解析 (Journal of Molecular Biology, 112, 535-542, 1977) あるいはコンピューターモデリング (Protein Engineering, 7, 1501-1507, 1994) などによる抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討するなどの種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて上記 3 (4) に記載の PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増幅産物について上記 3 (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

上記 3 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の上流に、上記 3 (4) および (5) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

例えば、上記 3 (4) および (5) でヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上記 3 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングすることができる。

#### (7) ヒト化抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、上記 3 (3) および (6) に記載のヒト化抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7 細胞

(ATCC CRL-1651) が一般に用いられる (Methods in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1991)。COS-7 細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法 (Methods in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1991)、リポフェクション法 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84, 7413-7417, 1987) などがある。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量及び抗原結合活性は ELISA (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) などにより測定できる。

#### (8) ヒト化抗体の安定発現

上記 3 (3) および (6) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に発現する形質転換細胞を得ることができ

る。宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) などがあげられる。ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL-1581)、マウス P3X63-Ag8.653 細胞 (ATCC CRL-1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfr と表記する) が欠損した CHO 細胞 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77, 4216-4220, 1980)、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL-1662、以下、YB2/0 細胞と表記する) などがあげられる。

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に発現する形質転換体は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418 と表記する) などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地に FBS などの各種添加物を添加した培地などを用いることができる。得られた形質転換細胞を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は、ELISA により測定できる。また、形質転換細胞は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、dhfr 増幅系などを利用してヒト化抗体の発現量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換細胞の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996)。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下、PAGE と表記する: Nature, 227, 680-685, 1970) やウェスタンブロッティング法 (Antibodies: A Laboratory Manual,

Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) などで測定することができる。

#### (9) ヒト化抗体の活性評価

ヒト化抗体の活性評価は、上記 1(7)と同様にして行うことができる。

#### 4. 抗体断片の作製

抗体断片は、上記 1 および 2 に記載の抗 hIGF 抗体をもとに遺伝子工学的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。

遺伝子工学的手法としては、目的の抗体断片をコードする遺伝子を構築し、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、大腸菌などの適当な宿主を用いて発現、精製を行うなどの方法があげられる。

蛋白質化学的手法としては、ペプシン、パパインなどの蛋白質分解酵素を用いた部位特異的切断、精製などの方法があげられる。

抗体断片として、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、diabody、dsFv、CDR を含むペプチドの製造法について以下に具体的に説明する。

##### (1) Fab の作製

Fab は、蛋白質化学的には IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテイン A 結合性を有する IgG サブクラスであれば、プロテイン A カラムに通すことで、IgG 分子や Fc 断片と分離し、均一な Fab として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, 1995)。プロテイン A 結合性を持たない IgG サブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、Fab は低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる

(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, 1995)。また、Fab は遺伝子工学的には、多くは大腸菌を用いて、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 3(2)、3(4) および 3

(5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、Fab 発現用ベクターにクローニングし、Fab 発現ベクターを作製することができる。Fab 発現用ベクターとしては、Fab 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いるこ

とができる。例えば、pIT106 (Science, 240, 1041-1043, 1988) などがあげられる。Fab 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズムに Fab を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある Fab とすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、培養上清中に活性を持った Fab が漏出する。リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一な Fab を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company, 1992)。

## (2) $F(ab')_2$ の作製

$F(ab')_2$  は、蛋白質化学的には IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Fab と同様の精製操作により、均一な  $F(ab')_2$  として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press, 1995)。また、下記 4 (3) に記載の Fab' を o-PDM やビスマレイミドヘキサンなどのようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、DTNB[5, 5' -dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] で処理し、S-S 結合させる方法によっても作製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

## (3) Fab' の作製

Fab' は、上記 4 (2) に記載の  $F(ab')_2$  をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、Fab' は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 3 (2)、3 (4) および 3 (5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、Fab' 発現用ベクターにクローニングし、Fab' 発現ベクターを作製することができる。Fab' 発現用ベクターとしては、Fab' 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pAK19 (BIO/TECHNOLOGY, 10, 163-167, 1992) などがあげられる。Fab' 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズムに Fab' を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある Fab' とすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、リゾチームによる



部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、プロテイン G カラムなどを用いることにより、均一な Fab' を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

#### (4) scFv の作製

scFv は遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 3 (2)、3 (4) および 3 (5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、scFv 発現用ベクターにクローニングし、scFv 発現ベクターを作製することができる。scFv 発現用ベクターとしては、scFv の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Pharmacia 社製)、pHFA (Human Antibodies & Hybridomas, 5, 48-56, 1994) などがあげられる。scFv 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面に scFv がファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、scFv 発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズムに scFv を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある scFv とすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィーなどを用いることにより、均一な scFv を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

#### (5) diabody の作製

diabody は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 3 (2)、3 (4) および 3 (5) に記載の抗体の VH と VL をリンカーがコードするアミノ酸残基が 8 残基以下となるように連結した DNA を作製し、diabody 発現用ベクターにクローニングし、diabody 発現ベクターを作製することができる。diabody 発現用ベクターとしては、diabody の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いるこ

とができる。例えば、pCANTAB5E (Pharmacia 社製)、pHFA (Human Antibodies Hybridomas, 5, 48, 1994) などがあげられる。diabody 発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズムに diabody を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある diabody とすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィーなどを用いることにより、均一な scFv を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

#### (6) dsFv の作製

dsFv は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。まず、上記 3 (2)、3 (4) および 3 (5) に記載の抗体の VH および VL をコードする DNA の適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換された DNA を作製する。作製した各 DNA を dsFv 発現用ベクターにクローニングし、VH および VL の発現ベクターを作製することができる。dsFv 発現用ベクターとしては、dsFv 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pULI9 (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994) などがあげられる。VH および VL の発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズムに dsFv を生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズムから VH および VL を得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある dsFv とすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過などにより、さらに精製することができる (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994)。

#### (7) CDR ペプチドの作製

CDR を含むペプチドは、Fmoc 法あるいは tBoc 法等の化学合成法によって作製することができる。また、CDR を含むペプチドをコードする DNA を作製し、作製した DNA を適当な発現用ベクターにクローニングし、CDR ペプチド発現ベクター

を作製することができる。発現用ベクターとしては、CDR ペプチドをコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pLEX (Invitrogen 社製)、pAX4a+ (Invitrogen 社製) などがあげられる。発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズムにを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズムから CDR ペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過などにより、精製することができる (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994)。

#### (8) 抗体断片の活性評価

精製した抗体断片の活性評価は、上記 1(7)と同様にして行うことができる。

#### C. 本発明の癌転移阻害剤

IGF-I および IGF-II の活性を阻害する物質、具体的には、上記のようにして調製される IGF-I および IGF-II に特異的に結合し、IGF-I および IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片は、癌転移阻害作用を有するため癌転移阻害剤として有用である。また、該抗体または抗体断片は癌の転移先の転移巣において、転移後増殖を開始し、病態が進行してしまった転移巣に対して、病態の進行を抑制する活性を有するため、転移巣の治療剤としても有用である。

本発明の癌転移阻害剤の対象疾患としては原発巣から転移することが統計的に頻度が高いものであれば特に限定はされないが、各種悪性及び良性腫瘍、例えば、悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器癌、肺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、尿管腫瘍、胆嚢癌、胆管癌、胆道癌、乳癌、肝臓癌、膵臓癌、睾丸腫瘍、上顎癌、舌癌、口唇癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、脳腫瘍、カポジ肉腫、血管腫、白血病、真性多血症、神経芽腫、網膜芽腫、骨髄腫、膀胱腫、肉腫、骨肉腫、筋肉腫、皮膚癌などがあげられる。

本発明の癌転移阻害剤は、特に、「hIGF 依存性増殖癌」の転移に有効である。

「hIGF 依存性増殖癌」とは、hIGF 存在下で増殖し、hIGF 濃度に依存して増殖度が増加する癌のことをいい、たとえば前立腺癌、大腸癌、乳癌、骨肉腫などがあげられる。

上記の各種悪性及び良性腫瘍が転移する先の転移巣としては、ヒトの器官において癌の転移が認められる器官であればいかなる器官も包含される。これらの器

官のうち、転移がよく認められる器官としては、例えば、肝臓、腎臓、胃、大腸、膵臓、乳腺、前立腺、膀胱、肺、気管支、脳、神経、リンパ節、副腎、骨などがあげられる。

本発明の癌転移阻害剤は、「hIGF 依存性増殖癌」の転移に有効であるため、上記の各器官のうち、hIGF が器官内に存在している器官への癌転移に特に有効であり、このような hIGF が器官内に存在している器官としては、例えば、肝臓、骨などがあげられる。

癌転移としては、血管やリンパ管を介した他所性転移以外に、血管やリンパ管を介さない同所性転移なども本発明の癌転移に包含される。

本発明の具体的な癌転移としては、例えば、前立腺癌の骨転移、大腸癌の肝転移、乳癌の骨転移、または多発性骨髄腫などの骨髄腫の骨転移などがあげられる。

本発明の癌転移阻害剤は、有効成分である IGF-I および IGF-II の活性を阻害する物質（以下、阻害物質と記す）である抗体または抗体断片を単独で含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

本発明の癌転移阻害剤の投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、あるいは口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができるが、静脈内投与が好ましい。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒド

ロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該阻害物質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該阻害物質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該阻害物質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

本発明の癌転移阻害剤の投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  ~  $10\text{mg}/\text{kg}$  である。

本発明の癌転移阻害剤の投与対象は、原発巣または転移巣が同時、またはそれぞれ単独で臨床的に確認される癌患者であり、外科療法、化学療法、放射線療法、その他全ての癌の治療法の施療の有無を問わない。

原発巣のみが臨床的に認められている癌患者であっても、原発巣以外の部位に臨床的に発見が困難な転移がある場合がある。このような臨床的に発見が困難な転移は、原発巣の治療後に、癌の再発の原因となる。本発明の癌転移阻害剤は、癌の転移巣に有効であるため、転移後の再発の予防剤としても使用することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を何ら限定するものでない。

(実施例 1) 抗 hIGF 抗体 KM1468 による前立腺癌細胞株の骨転移阻害効果の検討

(1) hIGF-I によるヒト前立腺癌細胞株 MDA PCa 2b 細胞の増殖に対する影響

癌転移阻害試験に先立ち、ヒト前立腺癌細胞株 MDA PCa 2b (ATCC CRL-2422) 細胞の増殖が、hIGF-I により影響を受けるかを調べた。

1 ウェルあたり  $5 \times 10^5$  個の MDA PCa 2b 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、20 % ウシ胎児血清 (SIGMA 社製) を含んだ F12K(+) 培地 {F12K (SIGMA 社製) に、25 ng/mL コレラトキシン (List Biological Laboratories 社製)、10 ng/mL 組換えヒト上皮成長因子 (Invitrogen 社製)、100 pg/mL ヒドロコルチゾン (SIGMA 社製)、0.1 nM ジヒドロテストステロン (SIGMA 社製)、1/100 容量 ITS-X サプリメント ( $\times 100$ ) (Gibco BRL 社製) を添加したもの} を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中で静置培養した。48 時間の培養後、各ウェルの培地に、無添加、または 1、10 あるいは 100 ng/mL の hIGF-I (R&D 社製) をそれぞれ添加した無血清 F12K 培地 (SIGMA 社製) に交換した。37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中で、無血清培地に交換してから 48 時間静置培養した後、細胞を回収してトリパンブルー染色により各ウェルの生細胞数を測定した。結果を第 1 図に示した。

第 1 図に示したように、MDA PCa 2b 細胞は hIGF-I 濃度依存的に増殖が促進されることが明らかとなった。

(2) hIGF-I 依存的な細胞増殖に対する抗 hIGF 抗体 KM1468 の影響

前項(1)で記載した hIGF-I 依存的に増殖する MDA PCa 2b 細胞を用いて、hIGF-I の依存的な細胞増殖が、抗 hIGF 抗体 KM1468 (以下、抗体 KM1468 と記す) により影響を受けるかを調べた。抗体 KM1468 は、後記参考例 1 に従って調製した。

実施例 1 (1) と同様に MDA PCa 2b 細胞を 37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 48 時間培養した後、100 ng/mL の hIGF-I (R&D 社製) および最終濃度 0、0.1、1、10  $\mu$ g/mL 抗体 KM1468 をそれぞれ添加した無血清 F12K 培地に交換し、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中で、静置培養した。無血清培地に交換してから 48 時間

後、細胞を回収してトリパンブルー染色により各ウェルの生細胞数を測定した。結果を第1図に示した。

第1図に示したように、抗体 KM1468 は hIGF-I 依存的な MDA PCa 2b 細胞の増殖を阻害した。また、その増殖阻害活性は、抗体 KM1468 濃度依存的であった。また、ネガティブコントロールである抗体 KM1762 (抗アベルメクチン抗体) は増殖を全く阻害しなかった。

### (3) 抗体 KM1468 による前立腺癌細胞株の骨転移阻害効果および転移巣に対する治療効果の検討

ヒト前立腺癌細胞株 MDA PCa 2b 細胞のヒト骨への転移モデルを用いて、抗 hIGF 抗体の骨転移阻害効果および転移巣に対する治療効果を検討した。

Yonou らの手法 (Cancer Research, 61, 2177-2182, 2001) に従って調製した約 1 cm<sup>3</sup> のヒト骨組織片を、6-8 週齢の NOD/SCID マウス (日本クレア) に皮下移植した。ヒト骨組織片の移植から 4 週間経過後、ヒト前立腺癌細胞株 MDA PCa 2b 細胞を  $4 \times 10^7$  個/mL になるように無血清培地に懸濁し、細胞懸濁液 100  $\mu$ L を移植したヒト骨組織片に注入した。初期転移モデルでは、ヒト前立腺癌細胞株 MDA PCa 2b 細胞の移植と同時に抗体の投与を開始した。一方、進行転移モデルでは、ヒト前立腺癌細胞株 MDA PCa 2b 細胞の移植から 4 週間経過した時点で抗体の投与を開始した。

各モデルにおけるマウスを、抗体 KM1468 を投与したマウス群 (以下、処置群と表記する)、陰性対象として抗体 KM1762 (抗アベルメクチン抗体) を投与したマウス群 (以下、無処置群と表記する) とに分けて、各群のマウスに抗体の投与を 1 回/週、4 週間の腹腔内投与で行った。処置群での一回当たりの抗体 KM1468 投与量は、初期転移モデルでは 0.01、0.1 または 2mg/kg とし、進行転移モデルでは 0.1、2 または 10mg/kg とした。無処置群での一回当たりの抗体 KM1762 投与量は、初期転移モデルでは 2mg/kg とし、進行転移モデルでは 10mg/kg とした。同時試験数は、処置群、無処置群共にそれぞれ 9~10 匹のマウスを用いて行った。両モデルとも、投与を開始してから 4 週間後に移植した骨組織の摘出し、同時に全採血を行った。

摘出したヒト骨組織を切片化し、骨組織中の腫瘍細胞が占める面積を、KS 300

system version 2.00 画像解析装置 (CarlZeiss 社製) を用いて解析した。また採取した血液から血清画分を分取し、前立腺癌の血清腫瘍マーカーである前立腺特異的抗原 (以下、PSA と表記する) 濃度を、ラジオイムノアッセイキット (Hybritech 社製) を用いて測定した。

初期転移モデルのマウスから摘出したヒト骨組織に占める転移腫瘍細胞の面積の割合を第 2 図 A に示し、進行転移モデルのマウスから摘出したヒト骨組織に占める転移腫瘍細胞の面積の割合を第 2 図 C に示した。初期転移モデル (第 2 図 A) の無処置群では、ヒト骨組織に占める腫瘍面積の割合は 6% だったが、同モデルの処置群では、無処置群と比較して投与した抗体量依存的に腫瘍面積の割合が減少していた。2mg/kg の最大投与量では、腫瘍面積の割合は無処置群と比較して約 1/20 に減少していた。同様に、進行転移モデル (第 2 図 C) においても、無処置群では骨組織内の腫瘍面積の割合が 38% であったが、同モデルの処置群では、無処置群と比較して投与した抗体量依存的に腫瘍面積の割合が減少していた。10mg/kg の最大投与量では、腫瘍面積の割合は無処置群と比較して約 1/4 に減少していた。

初期転移モデルのマウスの血清 PSA 濃度を第 2 図 B に、進行転移モデルのマウスの血清 PSA 濃度を第 2 図 D に示した。初期転移モデル (第 2 図 B) の無処置群では、血清 PSA 濃度が約 5 ng/mL であったが、同モデルの処置群では無処置群と比較して投与した抗体量依存的に血清 PSA が減少していた。2mg/kg の最大投与量では、血清 PSA は無処置群と比較して約 1/10 に減少していた。同様に、進行転移モデル (第 2 図 D) においても、無処置群では血清 PSA 濃度が約 45 ng/mL であったが、同モデルの処置群では無処置群と比較して投与した抗体量依存的に血清 PSA が減少しており、10mg/kg の最大投与量では、血清 PSA は無処置群と比較して約 1/2 に減少していた。

以上のことから、抗体 KM1468 は、マウス体内に移植されたヒト骨組織へのヒト前立腺癌細胞株 MDA PCa 2b 細胞の生着を阻害するだけでなく、生着後、時間が経過し、増殖してしまった癌細胞の増殖を阻害する活性を有していることが示された。従って、抗体 KM1468 は前立腺癌の骨転移を阻害するのみならず、転移巣に対しても有効な治療効果を有することが明らかとなった。



(実施例 2) 抗体 KM1468 による多発性骨髄腫細胞株の骨転移阻害効果の検討

(1) hIGF-I 刺激によるヒト多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 細胞への影響

骨転移阻害効果試験に先立ち、ヒト多発性骨髄腫細胞株である RPMI8226 細胞 (ATCC CCL-155) に対する hIGF-I 刺激による影響をウェスタンブロッティング (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988) により調べた。このとき、それぞれリン酸化された IGF-IR、Akt (別称: Protein Kinase B) および Mitogen-Activated Protein Kinase (以下、MAPK と記す) に特異的に反応する抗体を用いて、IGF-IR、Akt および MAPK のリン酸化を検出した。

各  $6 \times 10^6$  個の RPMI8226 細胞を無血清条件下で 24 時間培養した後、hIGF-I (R&D 社製) をそれぞれ 0、1 または 10 ng/mL の濃度で添加して、30 分間の刺激を与えた。刺激後の細胞は冷却したリン酸緩衝液にて洗浄後回収し、200  $\mu$ L の lysis buffer [150 mM NaCl、1 mM  $MgCl_2$ 、1% NP40、10% glycerol、8  $\mu$ L の complete protease inhibitor mixture (1 tablet/ml  $H_2O$ )、1 mM sodium orthovanadate および 10 mM NaF を添加した 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)] に溶解して氷上で 30 分間静置した後、遠心分離により上清を回収し、蛋白抽出を行った。

抽出したタンパク質は、SDS-PAGE により分画した後、定法に従ってメンブレンに転写し、各種抗体との反応性をウェスタンブロッティング (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988) により検討した。

リン酸化された IGF-IR、Akt または MAPK を認識する抗体として、それぞれ、抗リン酸化 IGF-IR ポリクローナル抗体 (BioSource International 社製)、抗リン酸化 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology 社製) または抗リン酸化 MAPK 抗体 (Cell Signaling Technology 社製) を、リン酸化および非リン酸化の区別無く IGF-IR、Akt または MAPK を認識する抗体として、それぞれ、抗 IGF-IR  $\beta$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社製)、抗 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology 社製) または抗 MAPK 抗体 (Cell Signaling Technology 社製) を用いた。結果を第

3 図に示した。

第 3 図に示したように、hIGF-I による刺激により、hIGF-IR および Akt のリン酸化が亢進した（第 3 図のレーン 1、6 および 7）。一方、hIGF-IR、Akt、リン酸化 MAPK および MAPK の発現変動は認められなかった。

このことは、hIGF-I による刺激が、MAPK を介する細胞増殖シグナルではなく、リン酸化された IGF-IR から Akt のリン酸化を介した細胞生存シグナルを伝達することを示している。

#### (2) hIGF-I の刺激に対する抗体 KM1468 の阻害効果の検討

前項(1)に記述したウェスタンブロッティングにより、hIGF-I の刺激に対する抗体 KM1468 の阻害効果を検討した。抗体 KM1468 またはネガティブコントロール抗体である KM1762（抗アベルメクチン抗体）は、無血清条件下で hIGF-I 添加前に添加した。抗体 KM1762 は  $1 \mu\text{g/mL}$  の濃度で、抗体 KM1468 は 0.1、1 または  $10 \mu\text{g/mL}$  の濃度で添加した。結果を第 3 図に示した。

第 3 図に示したように、抗体 KM1762 ではリン酸化は抑制されない（第 3 図のレーン 8）が、抗体 KM1468 は濃度依存的に hIGF-I 刺激による hIGF-IR および Akt のリン酸化を抑制できることが確認された（第 3 図のレーン 9～11）。

同様に RPMI8226 細胞を用いて、hIGF-I 刺激による細胞増殖に対する抗体 KM1468 の増殖阻害効果をトリパンブルー染色による生細胞数測定により、検討した。

無血清培地 RPMI1640（GIBCO 社製）で培養した RPMI8226 細胞を 1 ウェルあたり  $2 \times 10^5$  個で 6 ウェルプレートに播種し、各ウェルに、hIGF-I（R&D 社製）を無添加、もしくは  $1 \text{ng/mL}$  の濃度で添加し、さらに、ネガティブコントロール抗体である抗体 KM1762 または抗体 KM1468 を  $1 \mu\text{g/mL}$  の濃度で添加した。37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中で静置培養し、24 時間毎に生細胞数の測定を行い、96 時間後まで計測した。結果を第 4 図に示した。

第 4 図に示されるように、72 時間と 96 時間では、hIGF-I で刺激された細胞の増殖は、抗体 KM1468 によって抑制されることが有意差を持って示された ( $p < 0.0001$ )。

さらに、同様の実験において、抗体 KM1468 の濃度を段階的に変更し、96 時間

静置培養した後の生細胞数を測定した結果を第 5 図に示した。

第 5 図に示されるように、抗体 KM1468 の濃度依存的に RPMI8226 細胞の増殖は抑制されることが確認された。

以上のことから、抗体 KM1468 は hIGF-I 刺激による hIGF-IR から Akt のリン酸化を介した細胞生存シグナルを阻害することにより、hIGF-I 依存的な増殖を示す多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 細胞の増殖を阻害できることが示された。

### (3) 抗体 KM1468 による多発性骨髄腫細胞株の骨転移阻害効果の検討

ヒト多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 細胞を用いてヒト骨での腫瘍形成モデルを作製し、抗体 KM1468 の骨内での腫瘍形成に対する抑制効果の検討を行った。

Yonou らの手法 (Cancer Research, 61, 2177-2182, 2001) に従って作製した約 1cm<sup>3</sup> のヒト骨組織片を、6-8 週齢の NOD/SCID マウス (日本クレア) に皮下移植した。ヒト骨組織片の移植から 4 週間経過後、ヒト多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 細胞を  $1 \times 10^7$  個/mL になるようにリン酸緩衝液に懸濁し、細胞懸濁液 50  $\mu$ L を移植したヒト骨組織片に注入した。さらにヒト多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 細胞の移植と同時に抗体 KM1468 の投与を開始した。

抗体の効果を判定するために抗体 KM1468 を投与したマウス群 (以下、処置群と表記する)、陰性対象として抗体 KM1762 を投与したマウス群 (以下、対照処置群と表記する) とに分けて、各群のマウスに週 1 回の割合で 4 週間に渡って抗体の腹腔内投与を行った。処置群での 1 回当たりの抗体 KM1468 の投与量は、0.1 または 1mg/kg とした。対照処置群での 1 回当たりの抗体 KM1762 の投与量は 0.1mg/kg とした。試験数は、処置群ではそれぞれ 10 匹、対照処置群では 5 匹のマウスを用いて行った。投与を開始してから 4 週間後に移植した骨組織を摘出し、以下の方法で抗体 KM1468 の投与効果の判定を行った。

摘出したヒト骨組織を切片化し、骨組織中の腫瘍細胞が占める面積を、KS 300 system version 3.00 画像解析装置 (Carl Zeiss 社製) を用いて解析した。結果は第 6 図に示した。

第 6 図に示したように、対照処置群では、ヒト骨組織に占める腫瘍面積の平均値は  $18.52 \pm 9.173 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  であったのに対して、処置群では 0.1mg/kg の濃度で抗体 KM1468 を投与した場合は、 $2.530 \pm 0.9064 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  ( $p=0.0260$ ) であり、ま

た 1mg/kg の濃度で 抗体 KM1468 を投与した場合では、 $1.890 \pm 1.098 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  ( $p = \text{and } 0.0226$ ) といずれも対照処置群と比較して腫瘍面積の減少が認められた。

以上のことから、抗体 KM1468 は、マウス体内に移植されたヒト骨組織でのヒト多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 細胞の生着、増殖を阻害することができ、hIGF-I 依存的な多発性骨髄腫の骨転移を阻害できることが示された。

### (実施例 3) 抗体 KM1468 による乳腺癌細胞株の骨転移巣に対する治療効果の検討

抗 hIGF 抗体 KM1468 の乳癌骨転移巣に対する治療効果を、ヒト乳腺癌細胞株 MCF7 (ATCC HTB-22) 細胞のヒト骨への転移モデルを用いて検討した。ヒト乳腺癌細胞株 MCF7 は、参考例 2 の (3) で示されるように、hIGF 依存的な増殖を示す細胞株である。

Yonou らの手法 (Cancer Research, 61, 2177-2182, 2001) に従って調製した約  $400\text{mm}^3$  のヒト骨組織片を、6-8 週齢の NOD/SCID マウス (日本クレア) に皮下移植した。ヒト骨組織片の移植から 4 週間経過後、ヒト乳腺癌細胞株 MCF7 細胞を  $1 \times 10^8$  個/mL になるように無血清培地に懸濁し、細胞懸濁液  $50 \mu\text{L}$  を移植したヒト骨組織片に注入した。さらに、ヒト乳腺癌細胞株 MCF7 細胞の移植と同時に抗体の投与を開始した。

抗体 KM1468 を投与したマウス群 (以下、処置群と表記する)、陰性対象として抗体 KM1762 を投与したマウス群 (以下、対照処置群と表記する) とに分けて、各群のマウスに週 1 回の割合で、4 週間に渡って抗体の腹腔内投与を行った。処置群および対照処置群での一回当たりの抗体の投与量は  $2\text{mg/kg}$  とした。同時試験数は、処置群、対照処置群共にそれぞれ 12 匹のマウスを用いて行った。いずれの群においても、抗体の投与を開始してから 4 週間後に移植した骨組織を摘出した。

摘出したヒト骨組織を切片化し、骨組織中の腫瘍細胞が占める面積を、KS 300 system version 2.00 画像解析装置 (CarlZeiss 社製) を用いて解析した。結果は第 7 図に示した。

第 7 図に示したように、対照処置群では、ヒト骨組織に占める腫瘍面積は平均

2. 70mm<sup>2</sup>だったが、処置群では、対照処置群と比較して腫瘍面積は平均 0.85mm<sup>2</sup>と約 30%に減少した。以上のことから、抗体 KM1468 は、マウス体内に移植されたヒト骨組織におけるヒト乳腺癌細胞株 MCF7 細胞の生着増殖を阻害することができ、hIGF-I 依存的な乳癌の骨転移を阻害できることが示された。

(実施例 4) 抗 mIGF-I 抗体および抗 mIGF-II 抗体による、大腸癌肝臓転移阻害効果

抗 mIGF 抗体のヒト大腸癌細胞株 HT29 (ATCC HTB-38) 細胞の肝臓への転移抑制効果を確認するため、マウスを用いて以下の実験を行った。

HT29 細胞を  $2 \times 10^7$  個/mL になるように PBS に懸濁し、該懸濁液 200  $\mu$ L を 9-10 週齢のオスの NOD/SCID マウス (日本クレア) の脾臓の被膜下に注入して移植した。HT29 細胞の移植と同時に、各マウスを各種処置群および無処置群からなる以下の 5 群に分け、抗体および PBS の投与を行った。併せて、各群の同時再現数を示した。

1. 無処置群 (PBS 投与) ; 10 匹
2. 抗 mIGF-I 抗体 (R&D 社製 AF791) 単独投与群; 8 匹
3. 抗 mIGF-II 抗体 (R&D 社製 AF792) 単独投与群; 6 匹
4. 抗 mIGF-I 抗体 (R&D 社製 AF791) と抗 mIGF-II 抗体 (R&D 社製 AF792) 併用投与群; 7 匹
5. 抗 mIGF-I 抗体 (R&D 社製 AF791) と抗体 KM1468 併用投与群; 7 匹

投与は、HT29 細胞の移植同日より開始し、1 回/週で 4 週間にわたり腹腔内に施した。処置群における一回当たりの投与量は、各抗体が一匹当たり 2.5  $\mu$ g となるようにし、無処置群には同容量の PBS を投与した。HT29 細胞は、腫瘍マーカーである癌胎児性抗原 (以下、CEA と表記する) を分泌するため、マウス血清中の CEA 値をアーキテクト TM. CEA キット (ダイナボット社製) を用いて測定し、肝臓における腫瘍細胞の増殖の指標とした。

第 8 図には、腫瘍移植後 28 日目のマウス血清中の CEA 値を示した。無処置群と比べて、それぞれ抗 mIGF-I 抗体または抗 mIGF-II 抗体の単独投与群では、腫瘍増殖を部分的に抑制した。一方、抗 mIGF-I 抗体と抗 mIGF-II 抗体の併用投与

群および抗 mIGF-I 抗体と抗体 KM1468 併用投与群は、各抗体の単独投与群に比べて、顕著な腫瘍の増殖抑制活性を示した。抗体 KM1468 はヒトの IGF-I および IGF-II を中和する抗体であるが、マウス IGF ファミリーに対しては IGF-II を選択的に中和する活性を示すことから、抗体 KM1468 は mIGF-II に対する中和抗体として機能していると考えられる。以上のことから、腫瘍細胞の転移には、IGF-I および IGF-II の両者が関与しており、腫瘍の抑制に対して IGF-I および IGF-II の両方の活性を同時に阻害することが効果的であることが明らかとなった。

さらに、抗 mIGF-I 抗体と抗体 KM1468 併用投与群の腫瘍増殖抑制活性の機構を解析する目的で、上記の無処置群および抗 mIGF-I 抗体と抗体 KM1468 併用投与群について腫瘍移植後 28 日目のマウスの肝臓の転移病巣より腫瘍切片を作製し、免疫組織化学的検討を行なった。肝臓を切除後、30%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、厚さ  $5\mu\text{m}$  の切片を作製した。切片を H&E 染色（病理標本の作り方、病理技術研究会編、1992）および EnVison システム（DAKO 社製）を用いて抗 cleaved caspase-3 抗体（Cell Signaling Technology 社製、200 倍希釈で使用）で染色した。検出にあたっては、切片をクエン酸緩衝液（pH6.0）中でマイクロウェーブ処理（95℃、20 分）を行い、抗原を賦活化して用いた。その結果、H&E 染色で抗 mIGF-I 抗体と抗体 KM1468 併用投与群において、無処置群と比べて多数のアポトーシス小体が観察され、また、抗 cleaved caspase-3 抗体で染色されるアポトーシス細胞の増加が認められた。

アポトーシス誘導の指標（apoptosis index: AI）として、1000 個の腫瘍細胞あたりの cleaved caspase-3 陽性細胞の割合（%）を求め、グラフ化した結果を第 9 図に示した。無処置群と比べて、処置群では有意なアポトーシス細胞の増加が認められた。以上の結果から、IGF-I および IGF-II の両方の活性を同時に阻害することにより、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導され、腫瘍増殖が抑制されることが明らかとなった。

（実施例 5） 抗 mIGF-I 抗体および抗 mIGF-II 抗体による、大腸癌の肝臓での転移病巣に対する治療効果

抗 mIGF 抗体のヒト大腸癌細胞株 HT29（ATCC HTB-38）細胞の肝臓での転移病

巢に対する治療効果を確認するため、マウスを用いて以下の実験を行った。

HT29 細胞を  $2 \times 10^7$  個/mL になるように PBS に懸濁し、該懸濁液 200  $\mu$ L を 9-10 週齢のオスの NOD/SCID マウス（日本クレア）の脾臓の被膜下に注入して移植した。HT29 細胞の移植 2 週間後、肝臓に転移が成立後に、マウスを以下の処置群、無処置群に分け、抗体および PBS の投与を行った。併せて、各群の同時再現数を示した。

1. 無処置群（PBS 投与）； 8 匹
2. 処置群（抗 mIGF-I 抗体と抗体 KM1468 併用投与群）； 9 匹

抗体は HT29 細胞の移植 2 週間後より投与を開始し、1 回/週、4 週間の腹腔内投与を行った。処置群における一回当たりの投与量は、マウス体重 1 g 当たり、抗 mIGF-I 抗体（R&D 社製 AF791）が 0.1  $\mu$ g、抗体 KM1468 が 1  $\mu$ g とし、無処置群には同容量の PBS を投与した。マウス血清中の CEA 値をアーキテクト TM. CEA キット（ダイナボット社製）を用いて測定し、肝臓における腫瘍細胞の増殖の指標とした。

第 10 図 A には、投与開始後 28 日目のマウス血清中の CEA 値を示した。無処置群と比べて、処置群は、優位な腫瘍の増殖抑制効果が認められた。第 10 図 B には、マウスの累積生存率を示した。投与開始後 41 日目に無処置群では全マウスが死亡したが、処置群では優位な延命効果が確認され、実験終了時の 42 日目で 4 匹が生存していた。以上のことから、IGF-I および IGF-II の両方の活性を同時に阻害することが、肝臓における大腸癌の転移病巣に対して有効な治療効果を示し、また、IGF-I および IGF-II の両方の活性を同時に阻害する治療法は延命効果があることが明らかとなった。

#### （参考例 1） 抗 hIGF モノクローナル抗体の作製

##### （1）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

組換え型 hIGF-I（R&D 社製）は、免疫原性を高める目的で以下の方法でメチル化 BSA（SIGMA 社製）とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、2 回蒸留水に溶解したメチル化 BSA を、メチル化 BSA:hIGF-I=1:4（重量比）になるように 4℃で混合し、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、連結

針付きシリンジを用いて完全フロインドアジュバントあるいは不完全フロインドアジュバントと容量比 1:1 で混合し、免疫原（以下、メチル化 BSA-hIGF-I と表記する）とした。

5 週令雌 SD ラットに、完全フロインドアジュバントを用いて上記のように調製したメチル化 BSA-hIGF-I (hIGF-I の 100  $\mu$ g 相当量) を投与し、2 週間後より不完全フロインドアジュバントを用いて同様に調製した免疫原を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。

眼底静脈叢より採血し、その血清中の抗体価を参考例 1 (4) に示す結合 ELISA で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

脾臓を MEM 培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で 1~2 分間処理し、赤血球を除去し、MEM で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

## (2) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株 P3-U1 を通常培地で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$  以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

## (3) ハイブリドーマの作製

参考例 1 (1) で得られたラット脾細胞と (2) で得られた骨髓腫細胞とを 10:1 になるよう混合し、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞に 37°C で攪拌しながら、 $10^2$  個のラット脾細胞あたり 0.2~1.0mL の融合培地 (2g の PEG-1000、2mL の MEM、0.7mL のジメチルスルホキシドの混液) を加え、1~2 分間毎に 1~2mL の MEM を数回加えた後、さらに、MEM を加えて全量が 50mL になるようにした。遠心分離 (900 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、緩やかに細胞をほぐした後、100mL の HAT 培地に懸濁した。

この懸濁液を 96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$ L/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37°C で 10~14 日間培養した。この培養上清を参考例 1 (4) に示す結合 ELISA を用いて、メチル化 BSA-hIGF-I に反応して、陰性対照であるメチル化 BSA-BSA [BSA を用いて上記参考例 1 (1) と同様の反応を行い作製したコンジュゲート] に反応しないウェルを選び、さらに HT 培地と通常培地に換え、



2 回の単一細胞化を行い、抗 hIGF-I モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。

その結果、第 1 1 図に示した反応性を有する KM1468、KM1469、KM1470、KM1471、KM1472 および KM1473 の 6 クローンのハイブリドーマを取得した。各ハイブリドーマが産生する抗体のサブクラスを、サブクラスタイピングキットを用いた ELISA により検討した結果、いずれも IgG2b であった。

#### (4) モノクローナル抗体の選択 (結合 ELISA)

ELISA プレートに固定化する抗原としては、参考例 1 (1) で作製したメチル化 BSA-hIGF-I および陰性対照としてメチル化 BSA-BSA を用いた。96 ウェル ELISA プレート (Greiner 社製) に、上述の抗原を hIGF-I あるいは BSA の濃度として  $10 \mu\text{g/mL}$  で  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA を含む PBS (以下、BSA-PBS と表記する) を  $100 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。BSA-PBS を捨て、被免疫ラット抗血清、抗 hIGF-I モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいは精製した抗 hIGF-I モノクローナル抗体を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを 0.05%Tween 20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を二次抗体として  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノービス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウムの 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を  $1 \mu\text{L/mL}$  で添加した溶液] を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と表記する) をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

#### (5) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した 8 週令 Balb/c スード雌マウスに参考例 1 (3) で得られたハイブリドーマクローンを  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹でそれぞれ腹腔内注射した。10 ~ 21 日後に、ハイブリドーマが腹水癌化したマウスから、腹水を採取 ( $1 \sim 8 \text{mL}$ /匹) し、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) して固形分を除去した。その後、カプリ

ル酸沈殿法 (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) により IgG 画分を精製し、精製モノクローナル抗体とした。

## (参考例 2) 抗 hIGF モノクローナル抗体の反応性の検討

### (1) hIGF-I の天然の立体構造に対する反応性

参考例 1 (3) で選択された抗 hIGF モノクローナル抗体の液相系における天然の立体構造を保つ hIGF-I に対する反応性を、下記に示す競合 ELISA で調べた。

参考例 1 (4) に示した、参考例 1 (1) で作製したメチル化 BSA-hIGF-I を固定化したプレートを準備し、 $20 \mu\text{g/mL}$  より 5 倍希釈で段階的に希釈した hIGF-I を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注後、抗 hIGF モノクローナル抗体の精製抗体を希釈した溶液 (KM1468: $6.0 \mu\text{g/mL}$ 、KM1470: $1.0 \mu\text{g/mL}$ 、KM1471: $0.16 \mu\text{g/mL}$ 、KM1472: $7.0 \mu\text{g/mL}$ 、KM1473: $1.2 \mu\text{g/mL}$ ) を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、混合して室温で 2 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノービス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウムの  $0.55\text{g}$  を  $1\text{L}$  の  $0.1\text{M}$  クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を  $1 \mu\text{L/mL}$  で添加した溶液] を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

第 12 図に示したように、本発明の 6 種の抗 hIGF モノクローナル抗体はいずれも hIGF-I の天然の立体構造に反応性を示した。また、本系において、最も高い感度を示した KM1468 を用いた場合、液相系に含まれる  $16\text{ng/mL}$  までの濃度の天然の立体構造を有する hIGF-I を検出可能であった。

### (2) 抗 hIGF モノクローナル抗体の hIGF ファミリーに対する反応性

精製した抗 hIGF モノクローナル抗体 KM1468 (以下、抗体 KM1468 と記す) の hIGF に対する反応性を検討した。第 13 図に、参考例 1 (4) に示した結合 ELISA により、抗体 KM1468 および市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 (Upstate biotechnology 社製) の hIGF-I との反応性を検討した結果を示した (抗体濃度は、 $30 \mu\text{g/mL}$  から 3 倍希釈で段階的に希釈)。ただし、sm1.2 の場合は、二次抗

体として 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス Ig 抗体 (DAKO 社製) を用いた。第 1 3 図に示したように、いずれの抗体も抗体濃度依存的な hIGF-I 結合活性を示したが、その活性の強さは、抗体 KM1468 の方が高かった。

次に、各抗体の hIGF-I に対する結合における hIGF-I (Pepro Tech EC 社製)、hIGF-II (Pepro Tech EC 社製)、ヒトインスリン (和光純薬社製) および mIGF-I (Pepro Tech EC 社製) による阻害活性を以下に示した競合 ELISA で検討した。

参考例 1 (4) に示したように抗原を固定化したプレートを準備し、 $4.0 \mu\text{g/mL}$  に希釈した各種抗体を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注後、 $20 \mu\text{g/mL}$  より 3 倍希釈で段階的に希釈した hIGF-I あるいは hIGF-II、または、 $10 \mu\text{g/mL}$  より 5 倍希釈で段階的に希釈したヒトインスリンあるいは mIGF-I を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、混合して室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、KM1468 の場合は、4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製)、sm1.2 の場合は、2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス Ig 抗体 (DAKO 社製) を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウムの 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を  $1 \mu\text{L/mL}$  で添加した溶液] を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。結果は、抗体のみを添加した時の OD415 を 100 として相対値 (%) で表示した。結果を第 1 4 図に示した。第 1 4 図に示したように、抗体 KM1468 の hIGF-I に対する結合は、hIGF-I (第 1 4 図 A) および hIGF-II (第 1 4 図 B) で強く阻害され、hIGF-I による結合の 50%阻害の濃度

(inhibition concentration 50 ; 以下、 $\text{IC}_{50}$  と表記する) は約  $0.3 \mu\text{g/mL}$  (約 39nM)、hIGF-II による  $\text{IC}_{50}$  は約  $0.4 \mu\text{g/mL}$  (約 58nM) と同程度の値を示した。一方、ヒトインスリンおよび mIGF-I では阻害は認められなかった。以上の結果から、抗体 KM1468 は、hIGF-I と hIGF-II の両方に特異的、かつ同程度の強さで反応することが明らかとなった。市販の抗 IGF-I 抗体である sm1.2 の hIGF-I に対する結合は、hIGF-I (第 1 4 図 A) により強く阻害され、hIGF-II (第 1 4 図 B) による阻害活性は弱かった。sm1.2 の hIGF-I による  $\text{IC}_{50}$  は約  $1.2 \mu\text{g/mL}$

(約 156nM) であったのに対し、hIGF-II による  $IC_{50}$  は  $>10 \mu g/mL$  ( $>1.45 \mu M$ ) であった。一方、ヒトインスリンおよび mIGF-I では阻害は認められなかった。

### (3) 抗 hIGF モノクローナル抗体の hIGF 依存性細胞増殖に対する影響

精製した抗体 KM1468 の hIGF 依存性細胞増殖に対する影響を検討した。抗体としては、KM1468、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 (Upstate biotechnology 社製) および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 (Upstate biotechnology 社製) を用いた。

ヒト乳癌細胞株 MCF7 (ATCC HTB-22)、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 (ATCC HTB-38) あるいはヒト骨肉腫細胞株 MG-63 (ATCC CRL-1427) を TF/BSA 培地 [D-MEM/F-12 (Gibco BRL 社製) に  $10 \mu g/mL$  のヒトトランスフェリン (Gibco BRL 社製)、 $200 \mu g/mL$  の BSA を添加した培地] で  $0.5 \sim 1 \times 10^5$  細胞/mL に調製し、96 ウェル培養用プレートに  $100 \mu L$ /ウェルで分注した。さらに、TF/BSA 培地で各種濃度に希釈した hIGF-I、hIGF-II あるいはヒトインスリンの各因子を  $50 \mu L$ /ウェルで、TF/BSA 培地で各種濃度に希釈した各抗体を  $50 \mu L$ /ウェルで添加し、 $37^\circ C$ 、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5 日間培養した。培養後、細胞増殖試薬 WST-1

(Roche 社製) を  $20 \mu L$ /ウェルで分注し、さらに、 $37^\circ C$ 、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2.5~4 時間培養した後に、OD450nm の吸光度 (以下、OD450 と表記する) をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

第 15 図 A には、ヒト乳癌細胞株 MCF7 の各因子による増殖曲線を示した。さらに、第 15 図 B には、40ng/mL の hIGF-I 存在下、第 15 図 C には、100ng/mL の hIGF-II の存在下、第 15 図 D には、100ng/mL のヒトインスリン存在下での、各抗体添加時の増殖を示した。第 15 図に示したように、KM1468 は、hIGF-I および hIGF-II による細胞増殖を同程度に強く阻害し、その活性は、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 よりも高かった。一方、ヒトインスリンによる増殖に対しては、いずれの抗体も影響を与えなかった。以上の結果は、参考例 2 (2) の競合 ELISA で認められた各抗体の結合特異性と良く相関しており、また、各抗体の結合により、hIGF-I および hIGF-II の活性が阻害されることを明確に示したものである。

第16図Aには、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 の各因子による増殖曲線を示した。さらに、第16図Bには、10ng/mL の hIGF-I 存在下、第16図Cには、10ng/mL の hIGF-II の存在下、第16図Dには、20ng/mL のヒトインスリン存在下での、各抗体添加時の増殖を示した。

第16図に示したように、KM1468 は、hIGF-I および hIGF-II による細胞増殖を同程度に強く阻害し、その活性は、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 よりも高かった。一方、ヒトインスリンによる増殖に対しては、いずれの抗体も影響を与えなかった。以上の結果は、参考例2(2)の競合 ELISA で認められた結合特異性と良く相関しており、また、各抗体の結合により、hIGF-I および hIGF-II の活性が阻害されることを明確に示したものである。さらに、第16図Bの KM1468、第16図Cの KM1468 および S1F2 を反応させた場合には、hIGF-I および hIGF-II を添加しない場合よりも細胞増殖が抑制された。このことから、HT-29 細胞は、自ら hIGF-I および hIGF-II を産生して増殖しており、その増殖効果も抗体の添加によって阻害できることが明らかとなった。

第17図Aには、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63 の各因子による増殖曲線を示した。さらに、第17図Bには、20ng/mL の hIGF-I 存在下、第17図Cには、20ng/mL の hIGF-II の存在下、第17図Dには、20ng/mL のヒトインスリン存在下での、各抗体添加時の増殖を示した。第17図に示したように、KM1468 は、hIGF-I および hIGF-II による細胞増殖を同程度に強く阻害し、その活性は、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 よりも高かった。一方、ヒトインスリンによる増殖に対しては、いずれの抗体も影響を与えなかった。以上の結果は、参考例2(2)の競合 ELISA で認められた結合特異性と良く相関しており、また、各抗体の結合により、各因子の機能が阻害されることを明確に示したものである。

### (参考例3) 抗 hIGF モノクローナル抗体の抗原認識部位の解析

#### (1) hIGF-I の部分ペプチドの合成

W001/64754 に記載の方法に従って、hIGF-I の部分ペプチドを合成した。合成

したペプチドは、hIGF-I の 1-18 番目（配列番号 1；以下、p1-18 と表記する）、14-30 番目（配列番号 2；以下、p14-30 と表記する）、24-35 番目（配列番号 3；以下、p24-35 と表記する）、29-41 番目（配列番号 4；以下、p29-41 と表記する）、36-47 番目（配列番号 5；以下、p36-47 と表記する）、41-56 番目（配列番号 6；以下、p41-56 と表記する）、52-70 番目（配列番号 7；以下、p52-70 と表記する）、53-61 番目（配列番号 8；以下、p53-61 と表記する）、61-70 番目（配列番号 9；以下、p61-70 と表記する）に相当するペプチドであり、hIGF-I の全長を網羅するように設計した。上記ペプチドにおいては、内部に存在する Cys については、Ser あるいは Ala に置換した配列を合成した。また、41-56 番目に相当する配列については、内部の Cys を有する配列（配列番号 10；以下、p41-56C と表記する）も合成した。

## (2) 抗 hIGF モノクローナル抗体の抗原認識部位の解析

上記 (1) で合成した各種ペプチドを用いて、抗 hIGF ラット抗体 KM1468 の抗原認識部位の解析を以下に示す競合 ELISA で検討した。

参考例 1 (4) に示したように抗原を固定化したプレートを準備し、 $4.0 \mu\text{g/mL}$  に希釈した各種抗体を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注後、 $50 \mu\text{g/mL}$  より 3 倍希釈で段階的に希釈した各種ペプチド溶液の単独あるいは種々の組合せ、あるいは hIGF-I を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、混合して室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体

(DAKO 社製) を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム] の  $0.55\text{g}$  を  $1\text{L}$  の  $0.1\text{M}$  クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を  $1 \mu\text{L/mL}$  で添加した溶液] を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。結果は、抗体のみを添加した時の OD415 を 100 とした相対値 (%) で表示した。結果を第 18 図に示した。第 18 図に示したように、KM1468 の hIGF-I に対する結合は、hIGF-I により濃度依存的に阻害されたが、各種ペプチドでは、単独あるいは組合せに拘わらず、阻害活性は認められなかった。以上の結果は、KM1468 が、hIGF-I の単なるアミノ酸一次配列では

なく、hIGF-I の立体構造を認識していることを強く示唆する結果である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。

#### 産業上の利用可能性

本発明の癌転移阻害剤は、前立腺癌の骨転移や大腸癌の肝転移などの癌転移を有意に阻害することができるので、癌治療のための医薬として臨床上極めて有用である。

また、本発明の癌転移阻害剤は、転移巣の腫瘍細胞の増殖抑制に特に有効であるので、癌転移の症状がはっきり現れていない患者へ予防的に投与することもできる。さらに、転移巣の腫瘍細胞の増殖抑制ができるため、病態が進行した転移巣に対する治療剤としても有効に用いることができる。

## 請 求 の 範 囲

1. インスリン様成長因子-I (IGF-I) およびインスリン様成長因子-II (IGF-II) の活性を阻害する物質を有効成分として含有する癌転移阻害剤。

2. 物質が、以下の (a) ~ (e) からなる群より選ばれる、請求項 1 に記載の阻害剤。

(a) IGF-I および IGF-II に特異的に結合し、IGF-I および IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片

(b) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を含む組成物

(c) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片を組み合わせてなる組成物

(d) IGF-I に特異的に結合し、IGF-I の活性を阻害する抗体または抗体断片、および IGF-II に特異的に結合し、IGF-II の活性を阻害する抗体または抗体断片の複合体

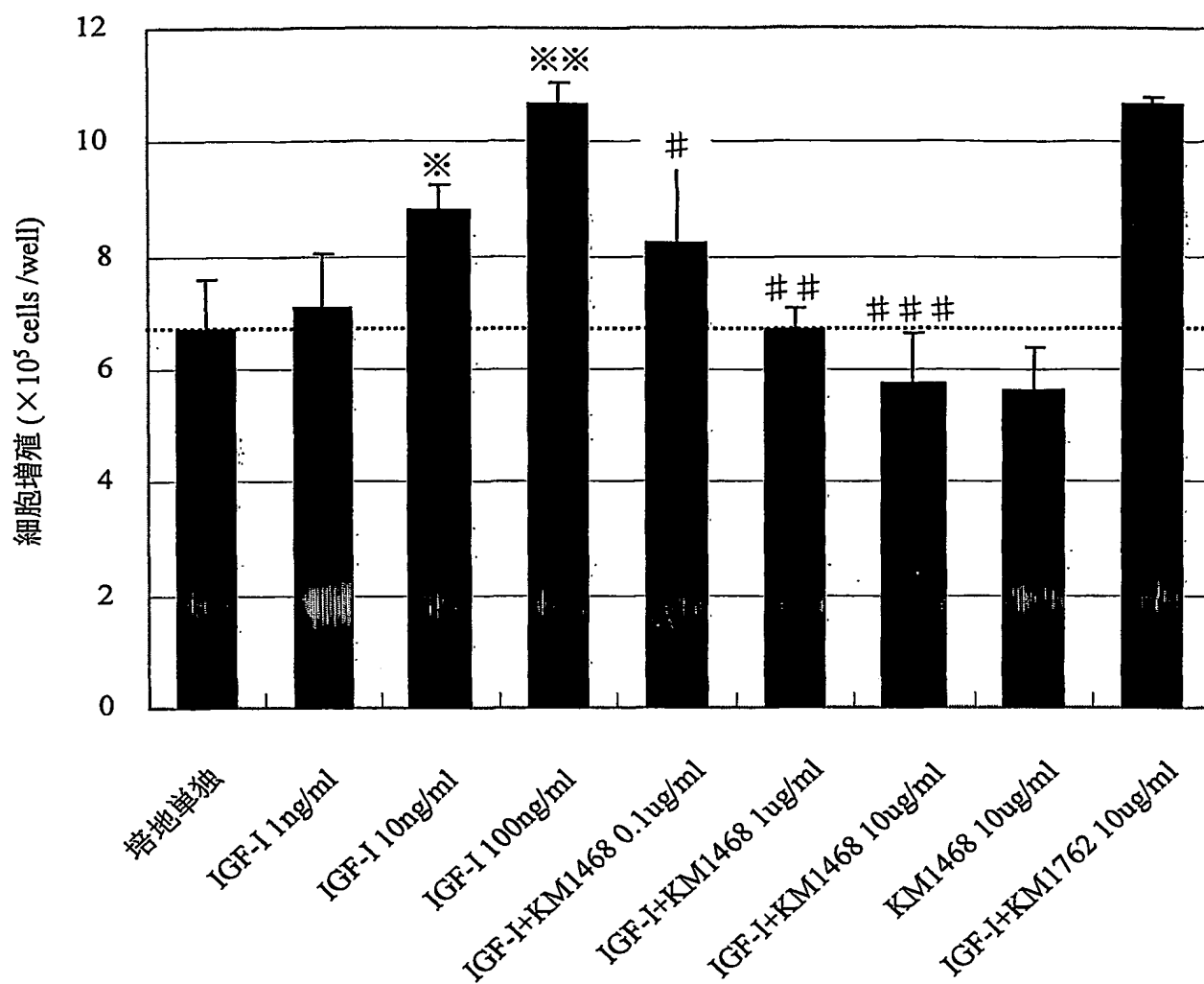
(e) 上記 (a) ~ (d) のいずれかと他分子を結合させた複合体

3. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 に記載の阻害剤。

4. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体 (scFv)、二量体化可変領域 (Diabody)、ジスルフィド安定化可変領域 (dsFv) および CDR を含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である、請求項 2 又は 3 に記載の阻害剤。



## 第1図



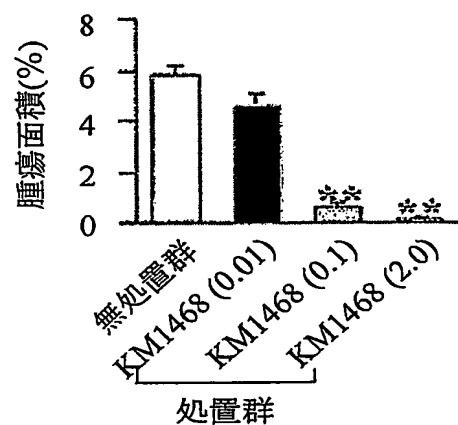
(※ $p=0.022$ , ※※ $p=0.0019$  培地単独との比較)

(# $p=0.037$ , ## $p=0.0002$ , ### $p=0.0008$  IGF-I 100ng/ml 処理のものとの比較)

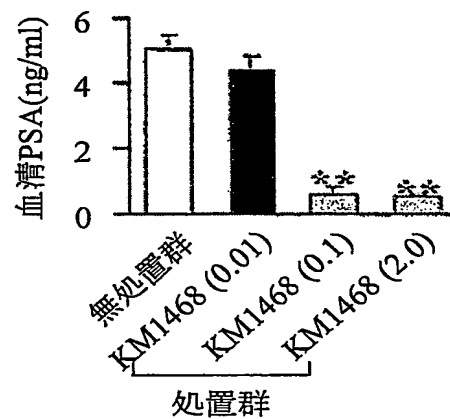
## 第2図

## 初期転移モデル

A

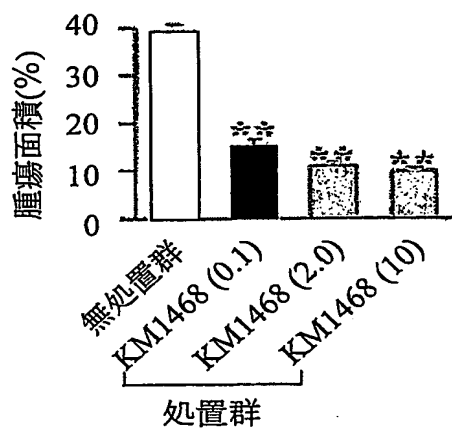


B

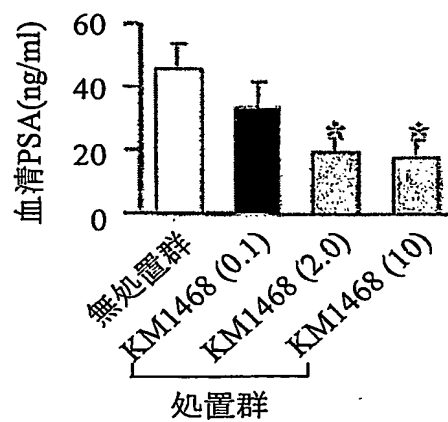


## 進行転移モデル

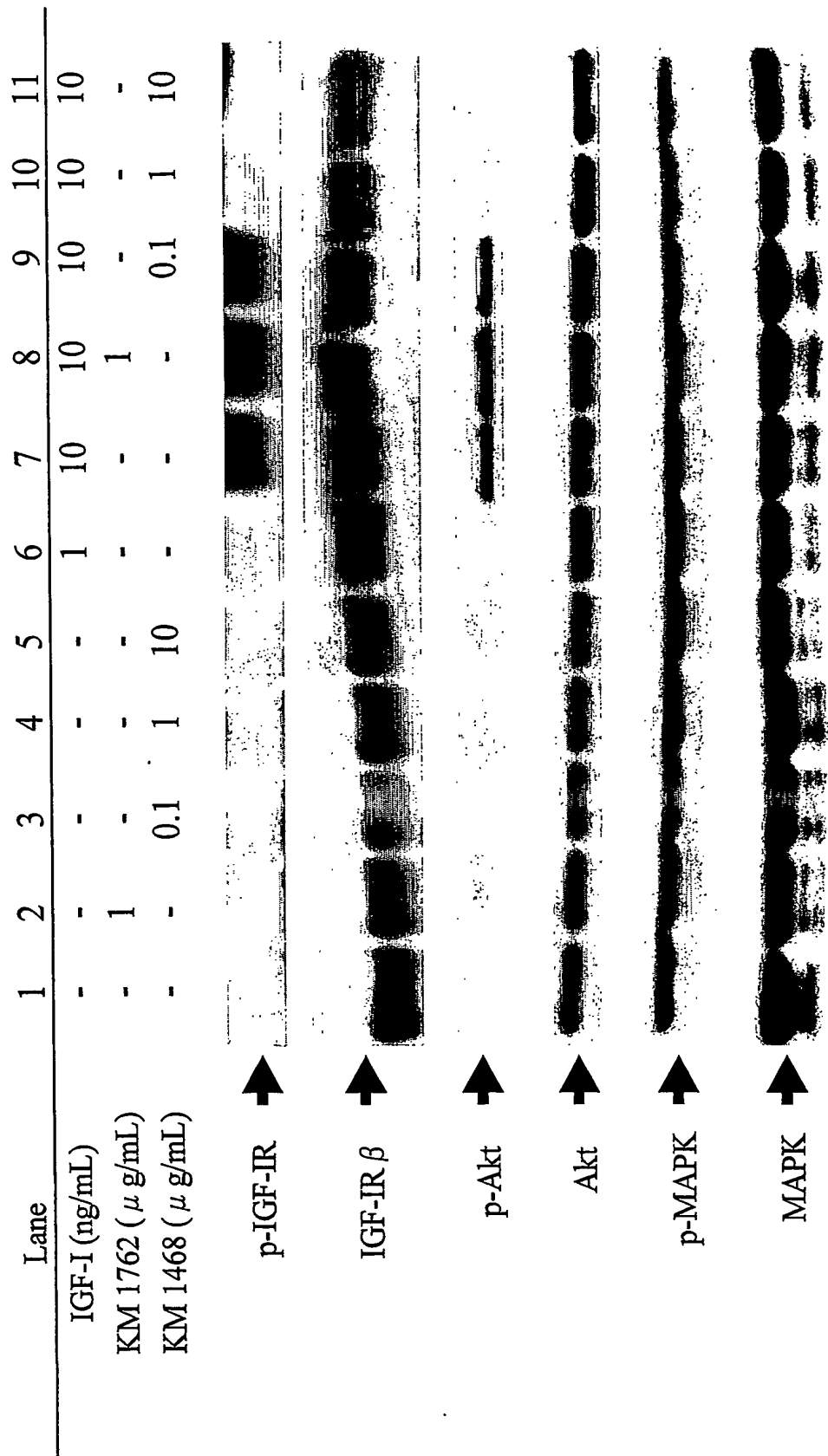
C



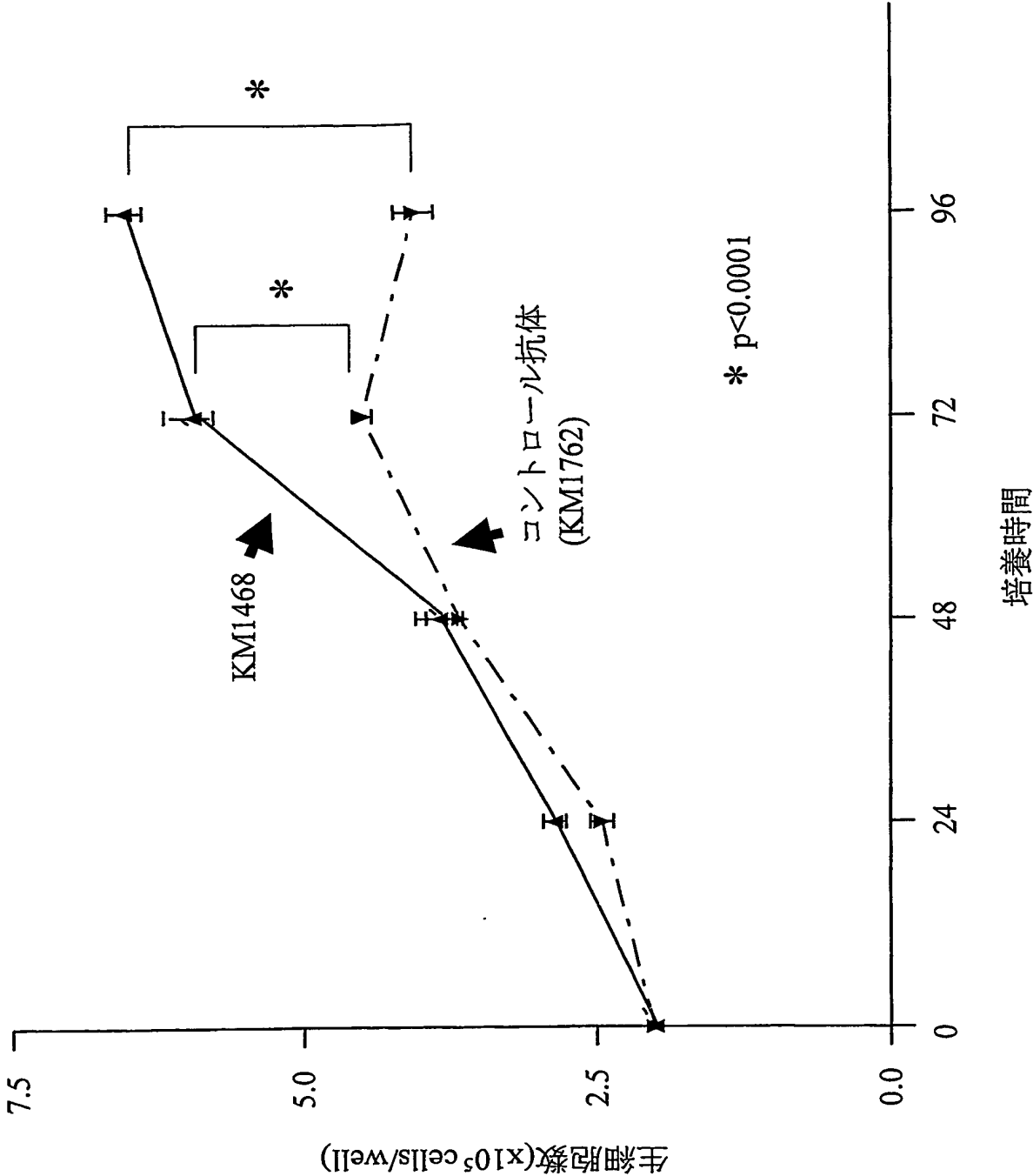
D

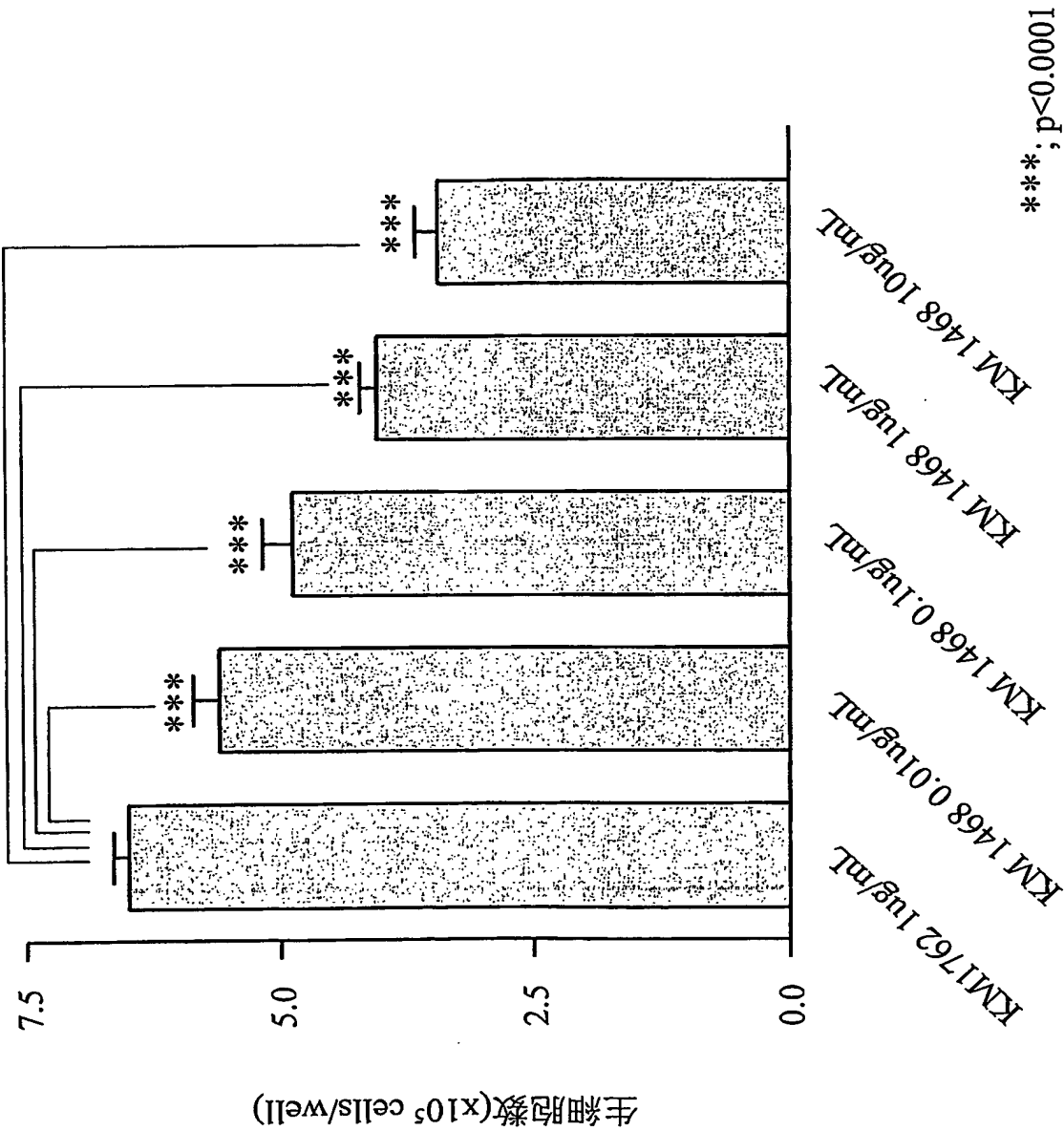


第3図



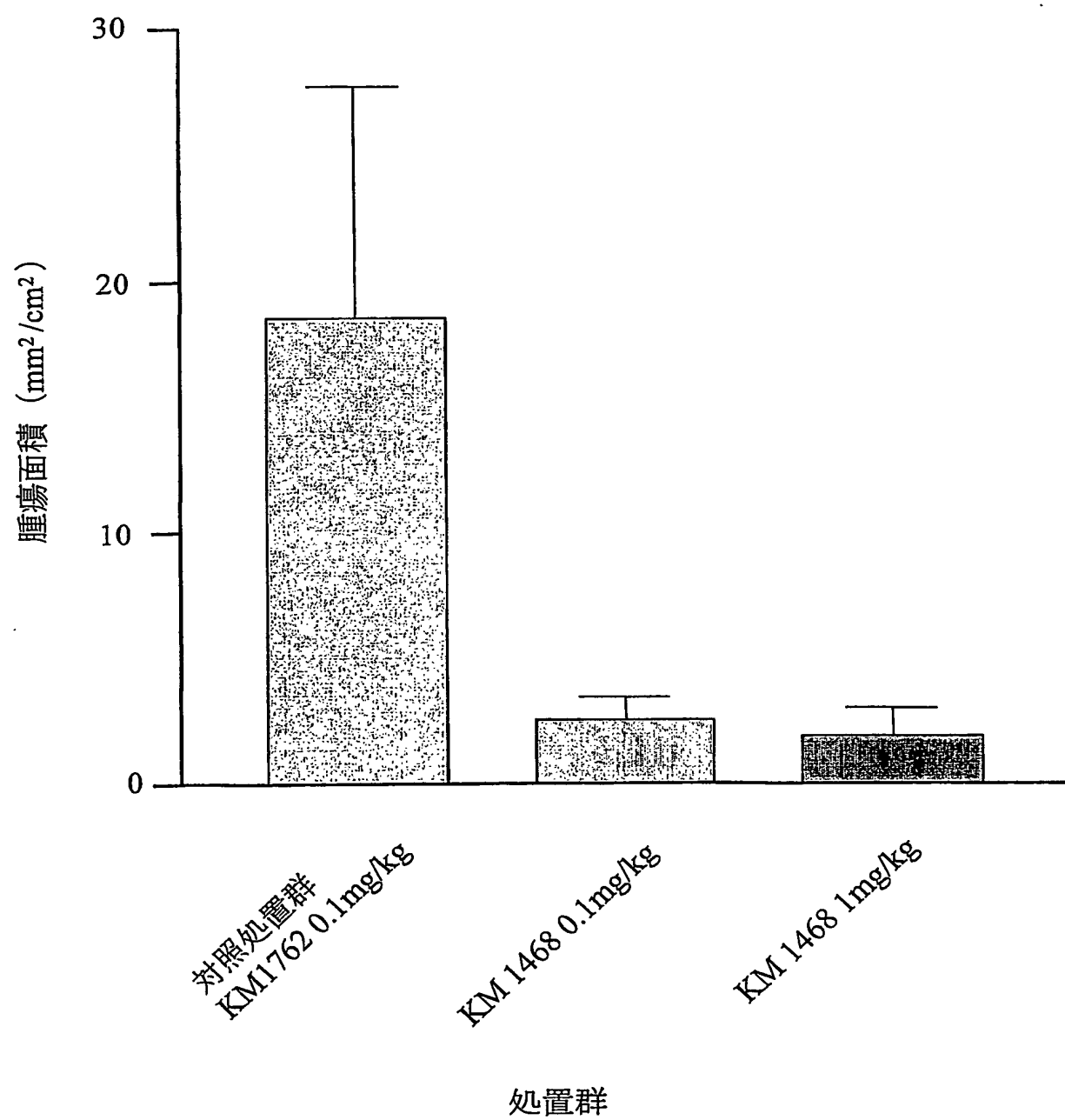
第4図



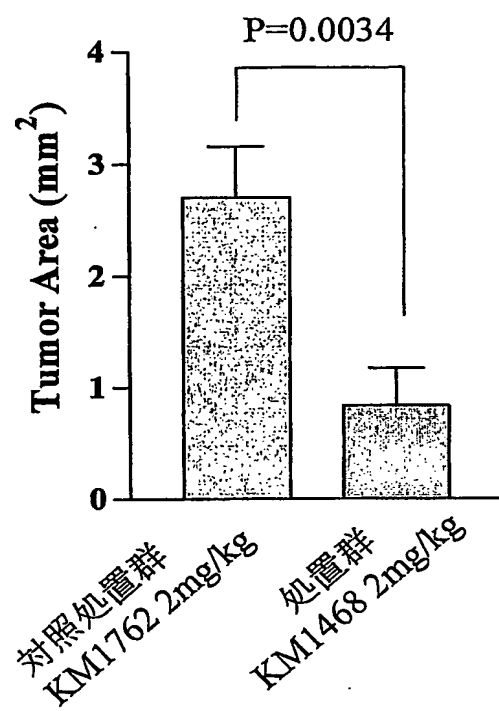


第5図

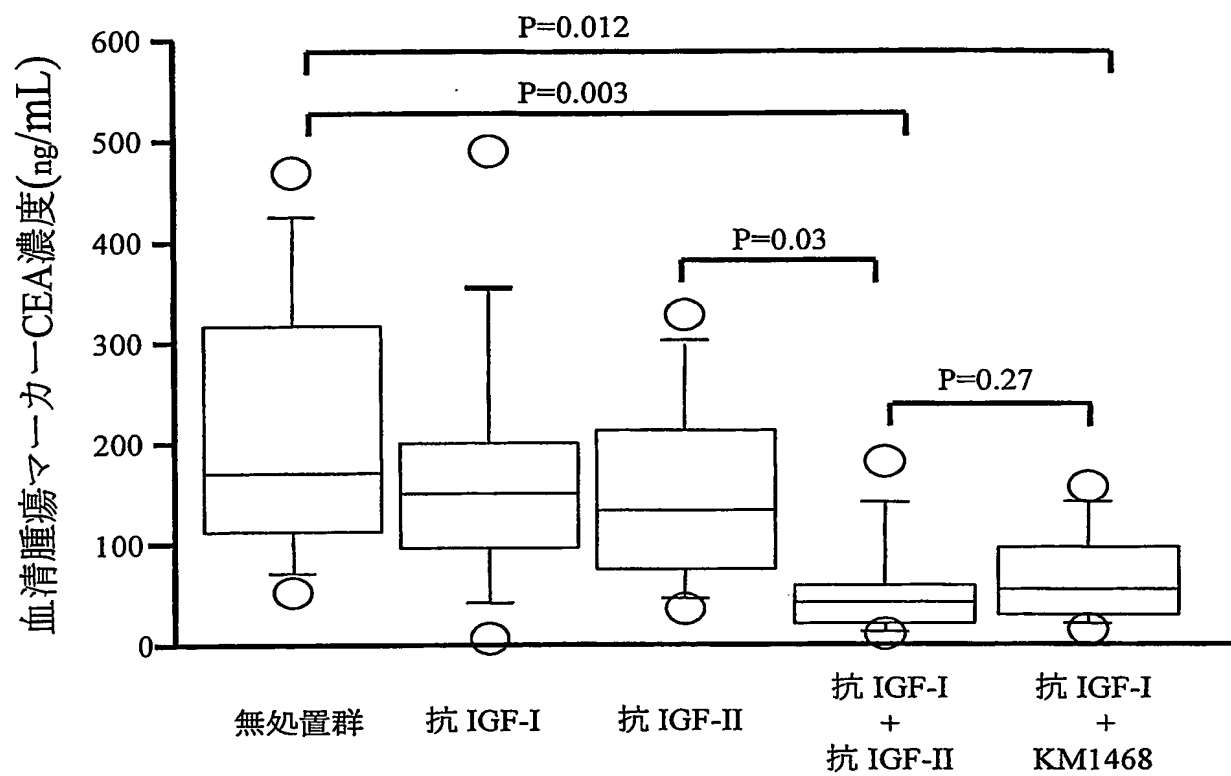
## 第6図



## 第7図

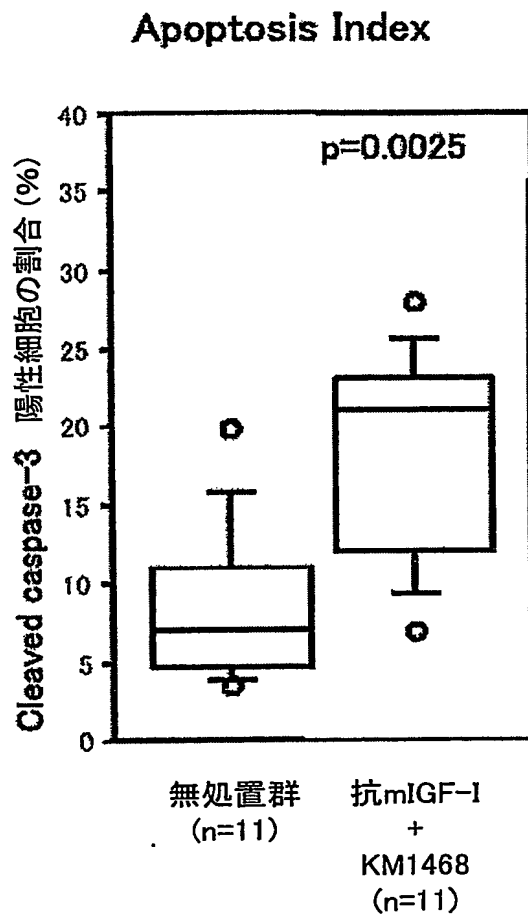


## 第8図



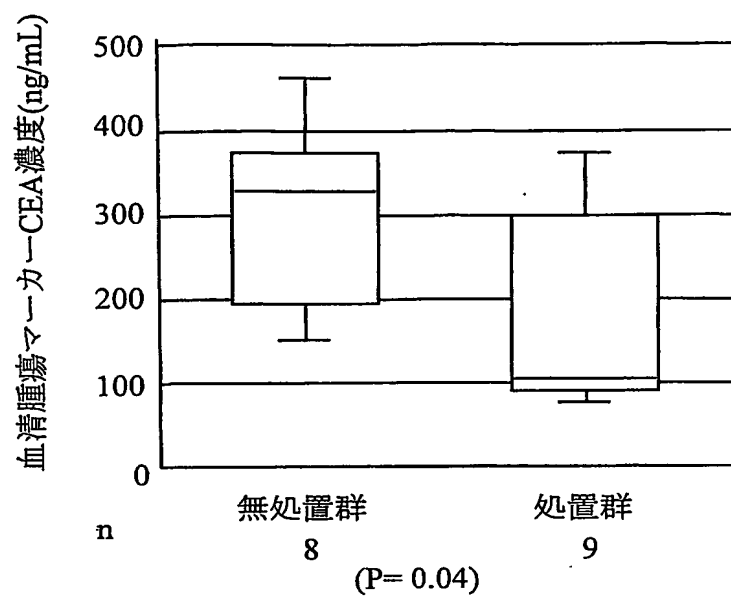


## 第9図

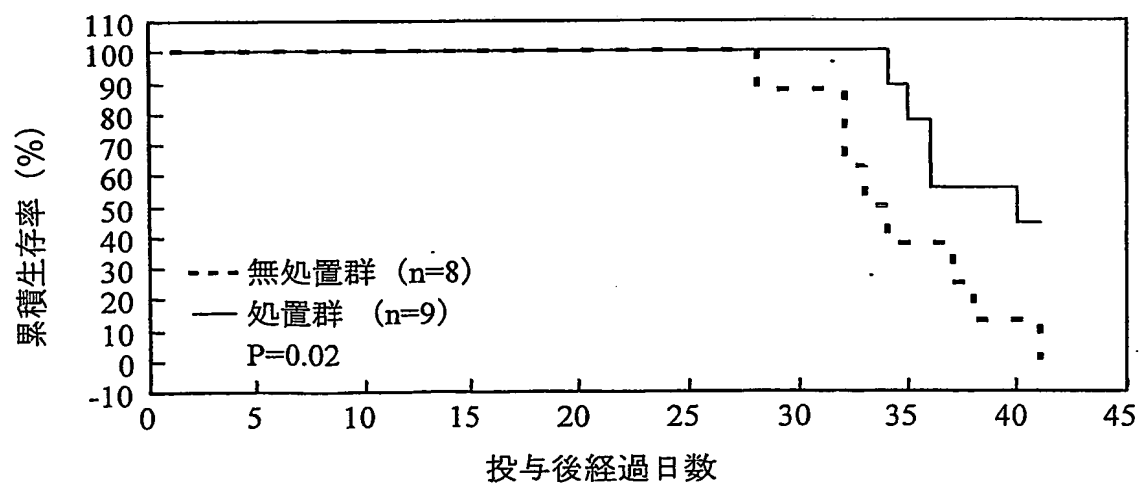


## 第 10 図

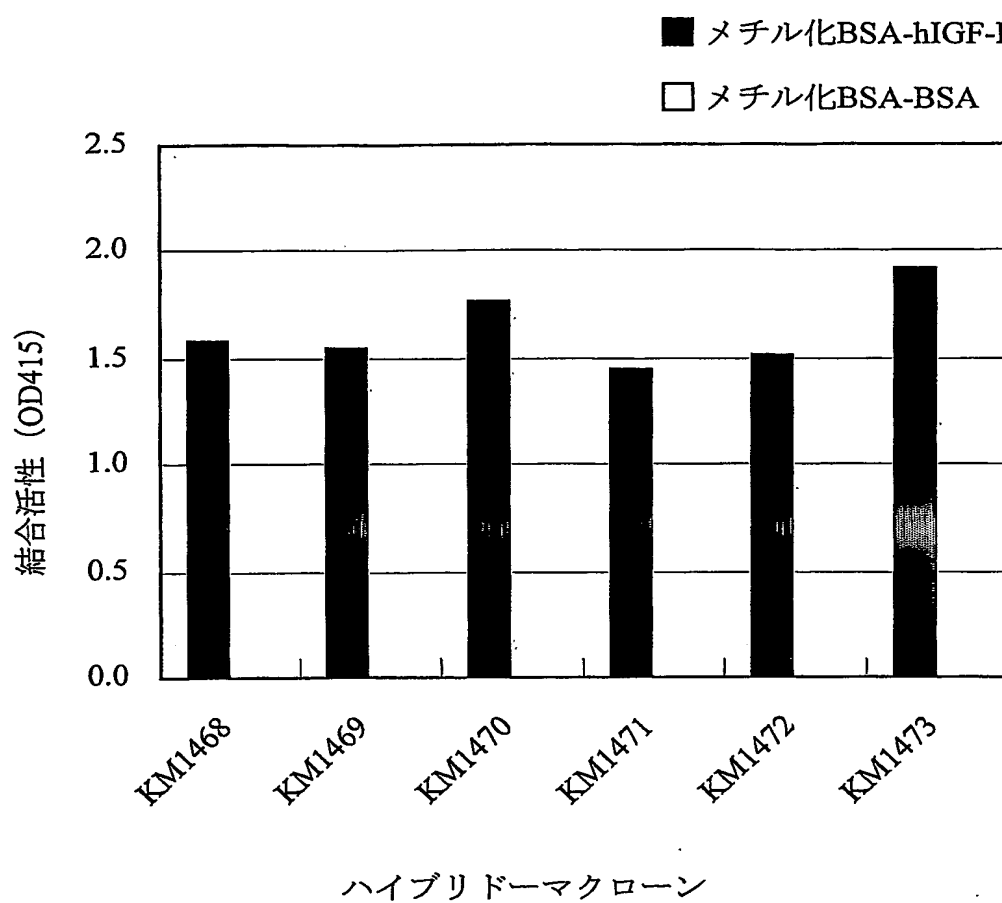
A.



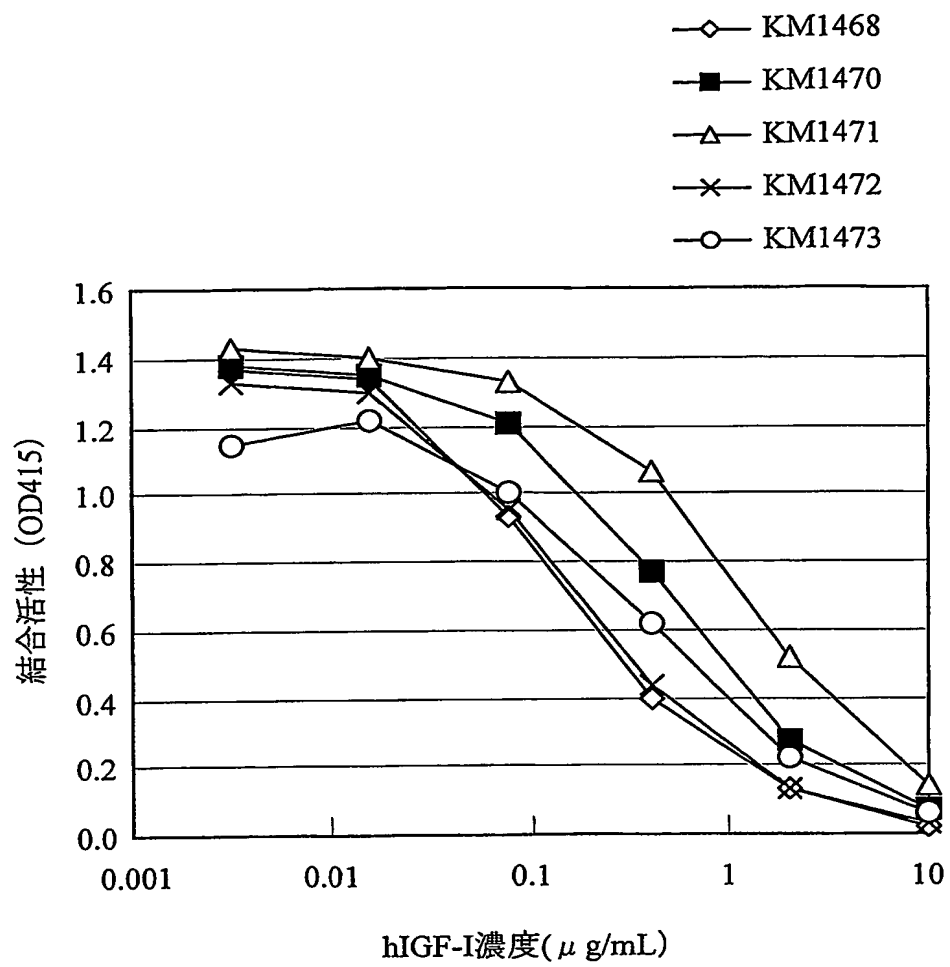
B.



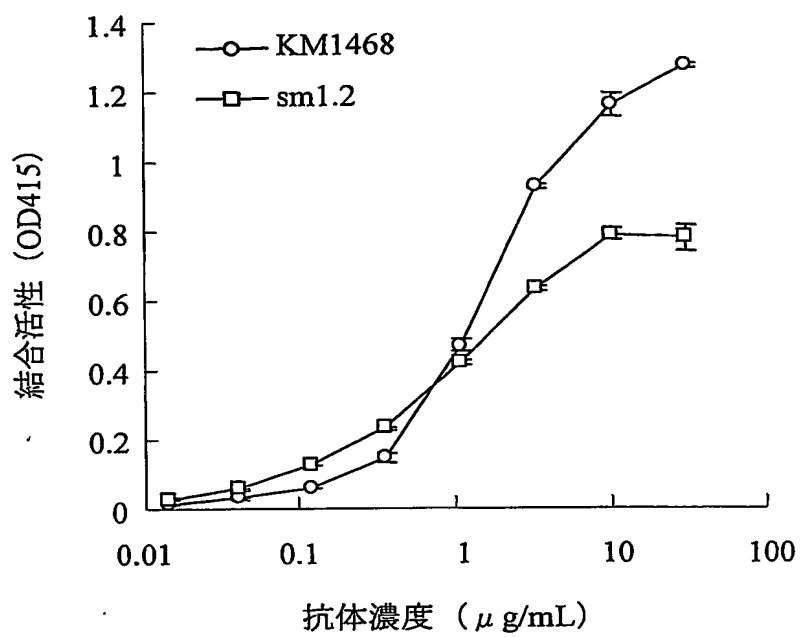
## 第 1 1 図



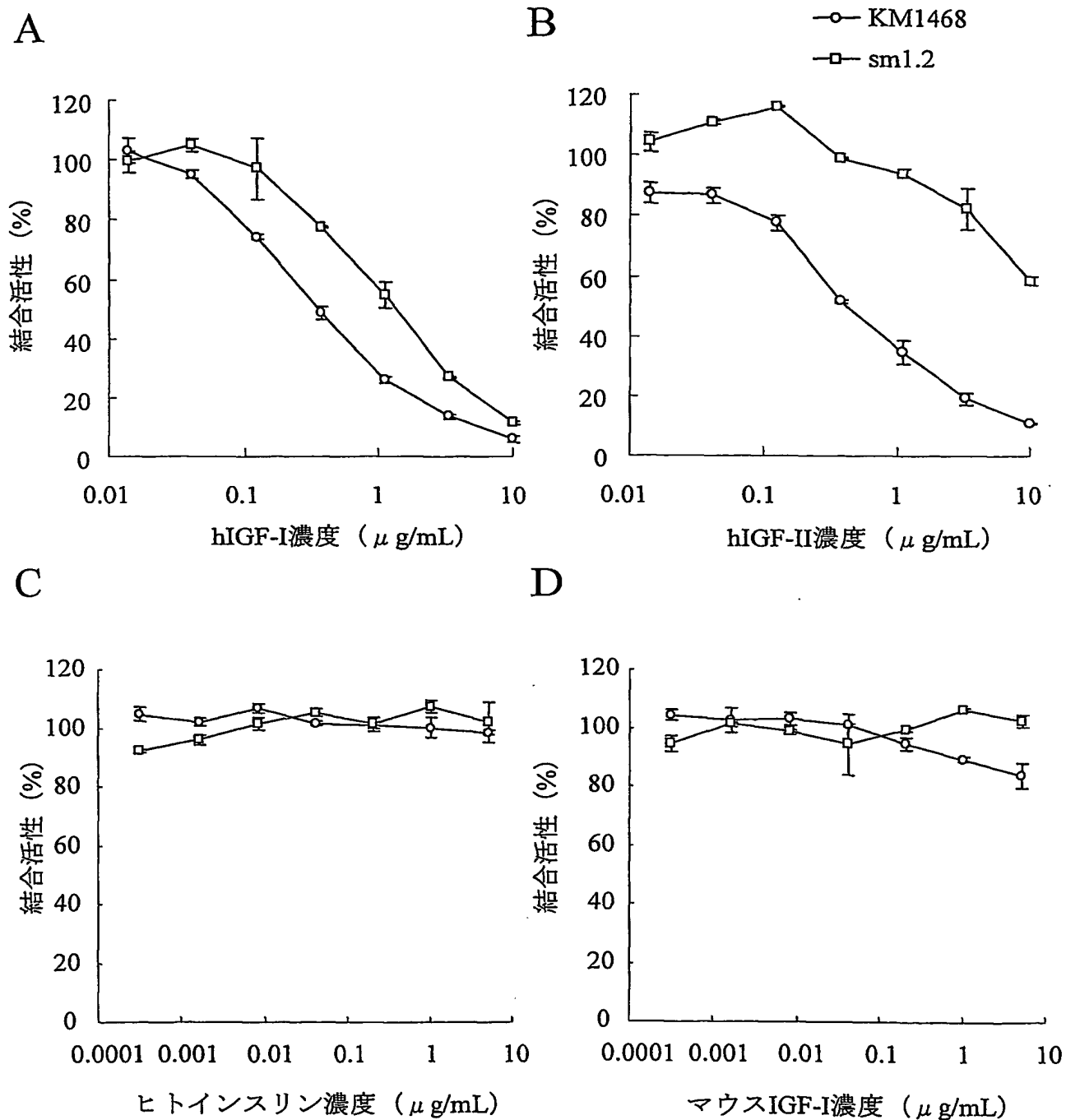
## 第 1 2 図



## 第 13 図

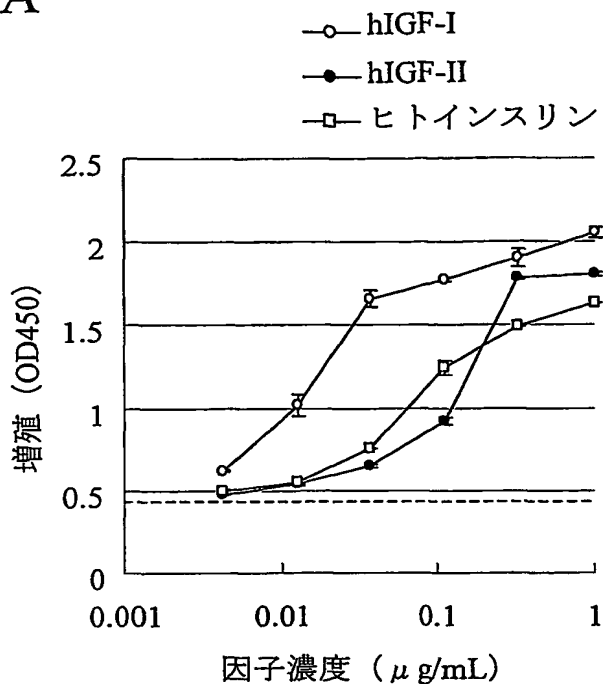


## 第 1 4 図

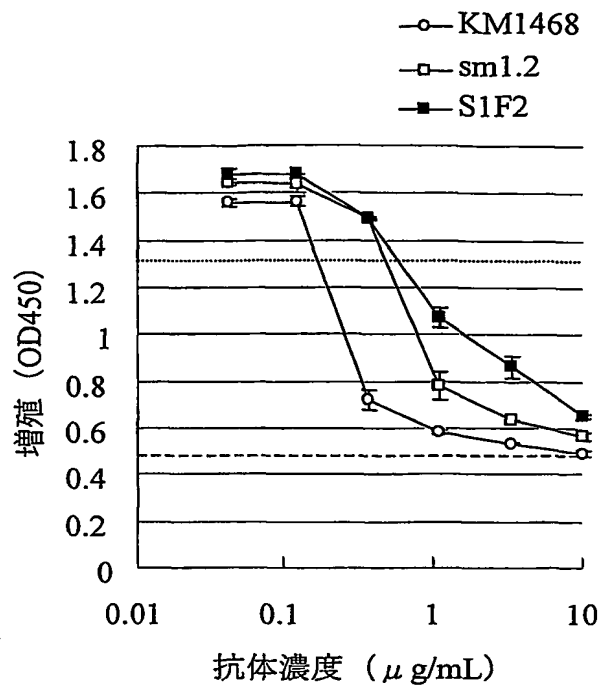


## 第 1 5 図

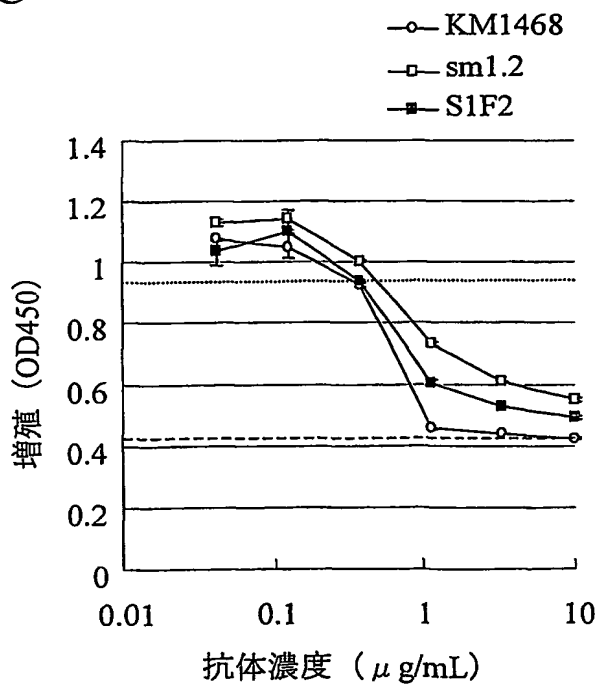
A



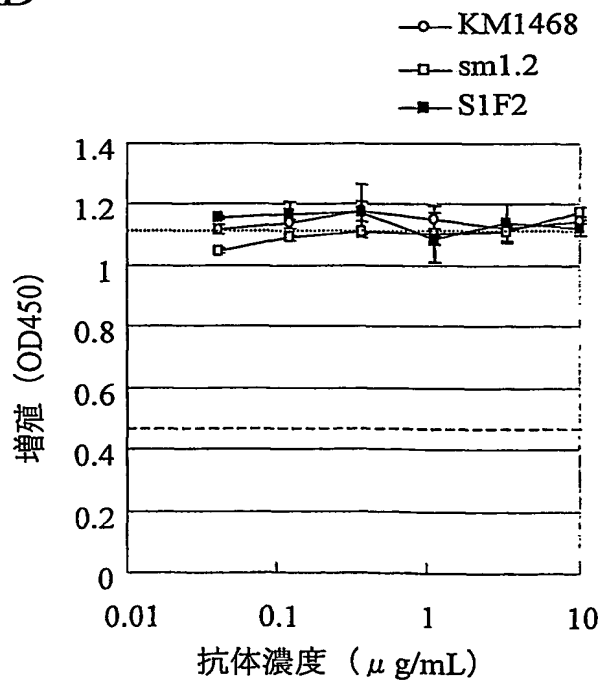
B



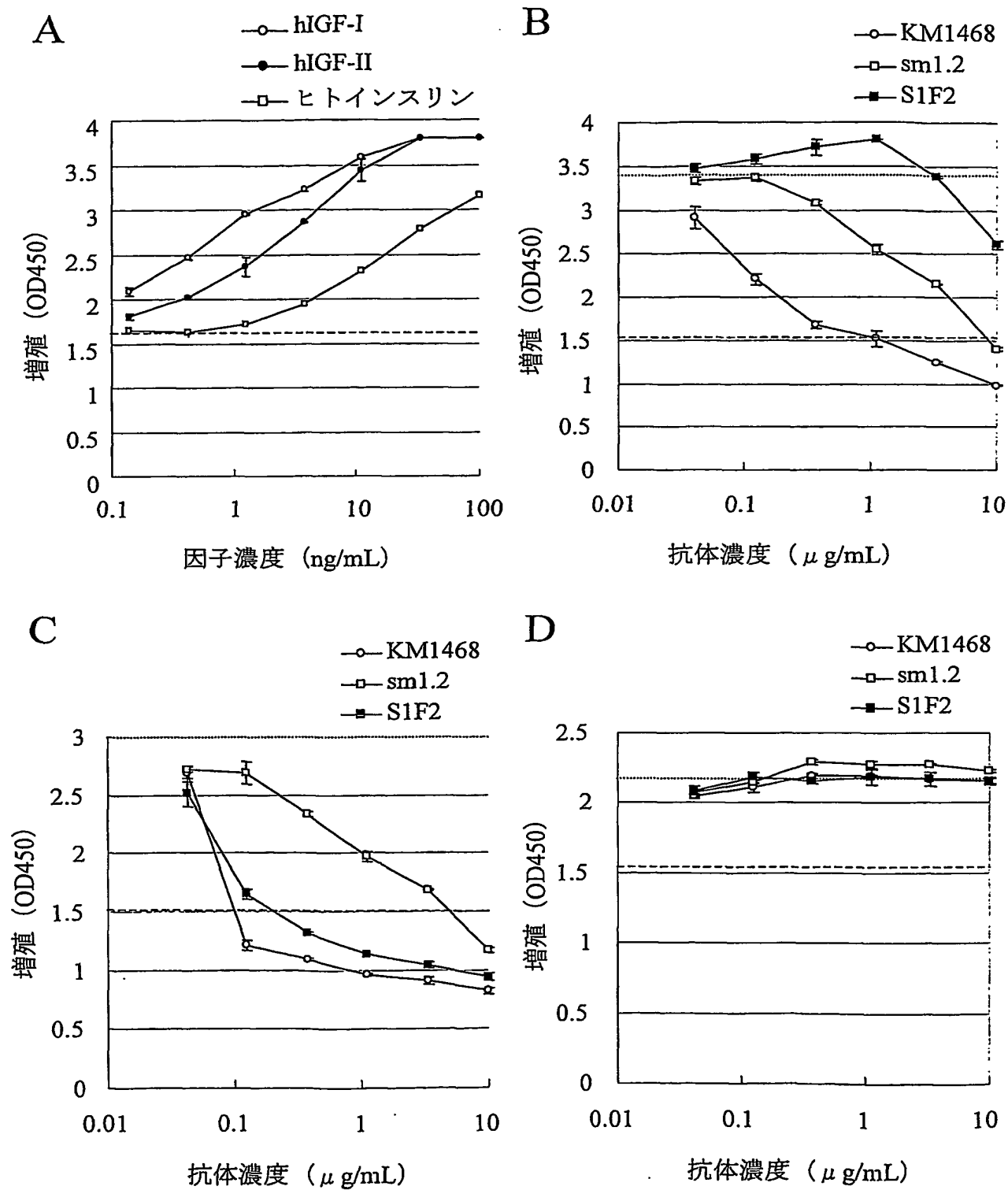
C



D

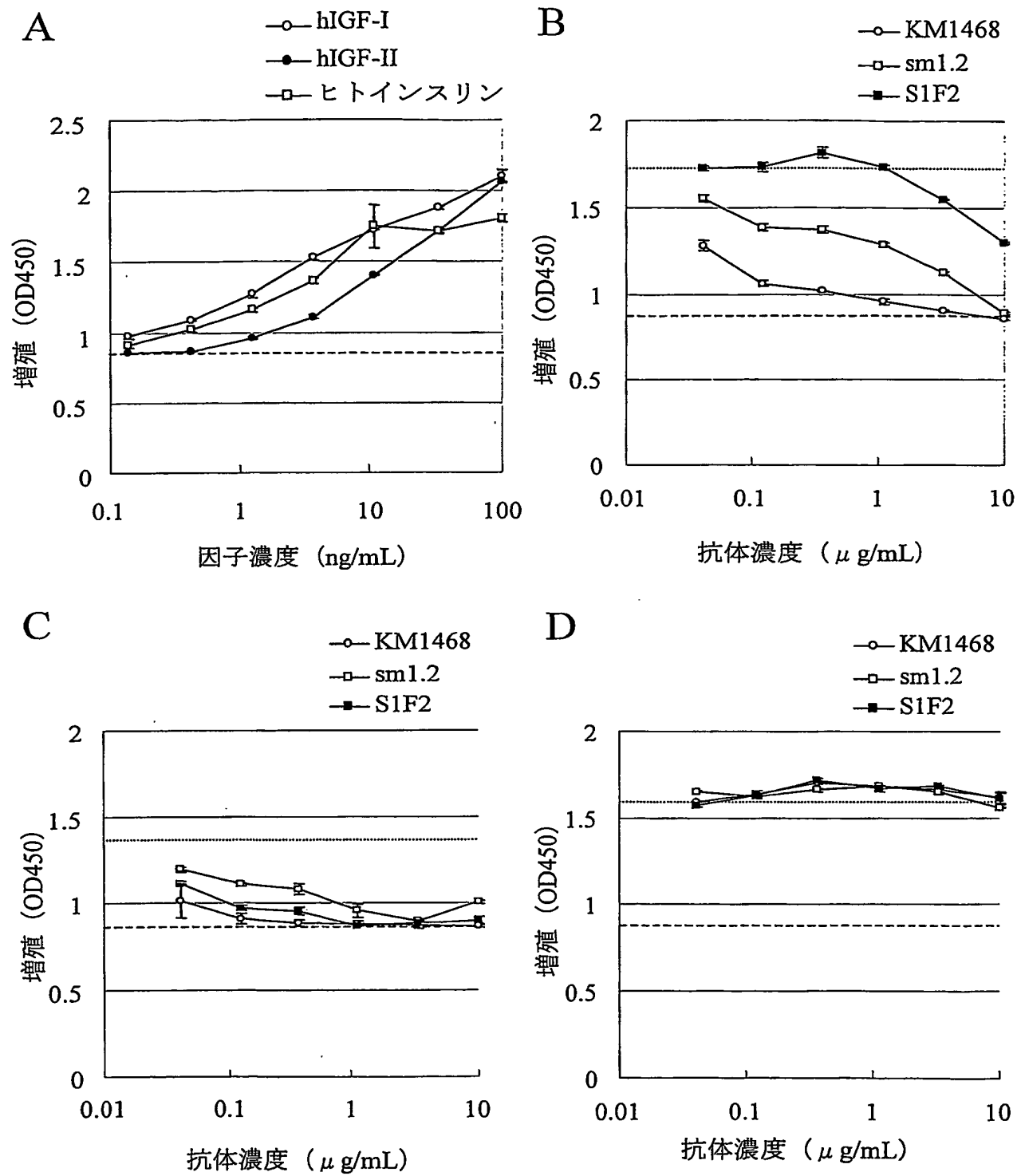


## 第 1 6 図



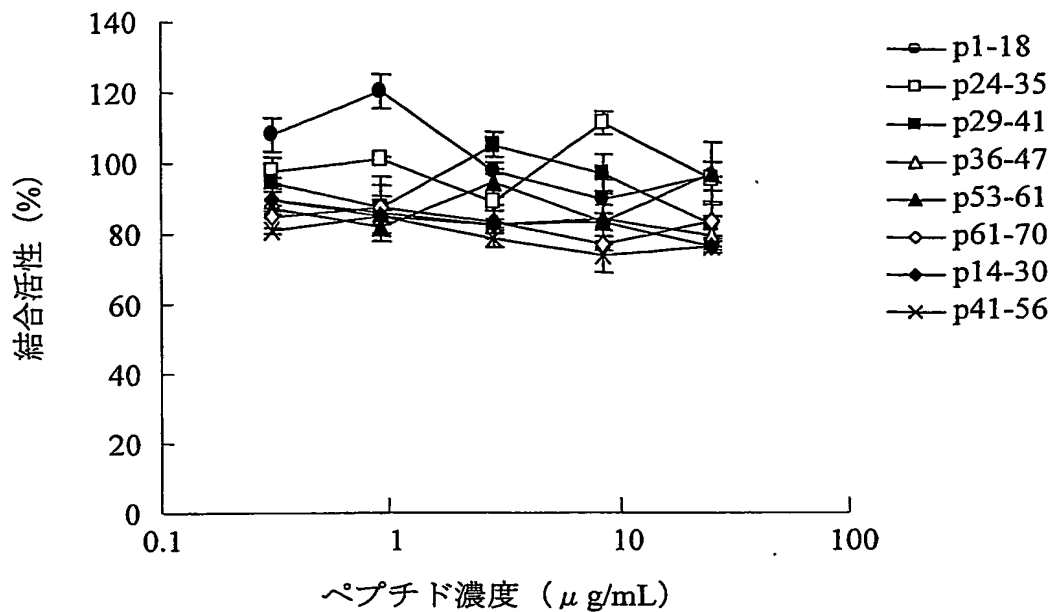


## 第 17 図

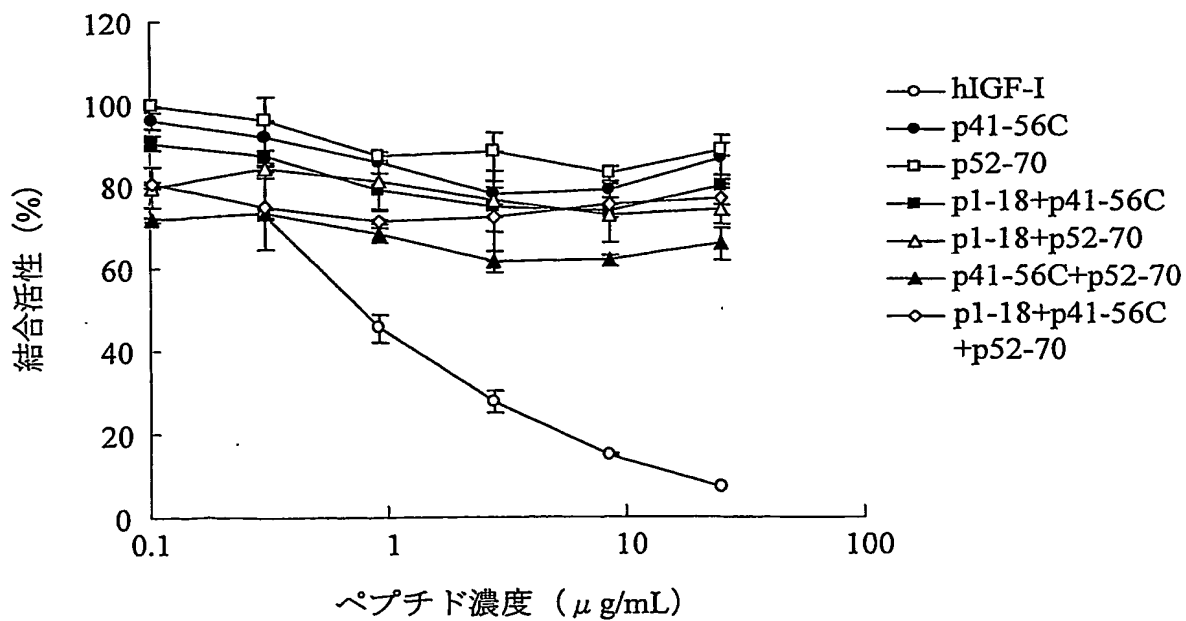


## 第 1 8 図

A



B



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<110> JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF NATIONAL CANCER CENTER

<120> Agent for inhibiting cancer metastasis

<130> PH-2217-PCT

<150> JP2003-297871

<151> 2003-08-21

<150> JP2004-139707

<151> 2004-05-10

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Pro Glu Thr Leu Ser Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

1

5

10

15

Val Cys

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Leu Gln Phe Val Ala Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro

1

5

10

15

Thr Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

1

5

10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys

1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Cys Thr Gly Ile Val Asp Glu Ala Ala Phe Arg Ser Ala Asp Leu Arg

1 5 10 15

Arg

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Ala Ala Pro Leu Lys Pro Ala

1

5

10

15

Lys Ser Ala

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys

1

5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala

1

5

10

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Cys Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg

1

5

10

15

Arg

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012330

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DUNN, Sandra E. et al., A Dominant Negative Mutant of the Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibits the Adhesion, Invasion, and Metastasis of Breast Cancer, Cancer Research, 1998, Vol.58, No.15, pages 3353 to 3361	1-4
Y	WANG, Yuli et al., Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis, Current Cancer Drug Targets, 2002, Vol.2, No.3, pages 191 to 207	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 November, 2004 (12.11.04)

Date of mailing of the international search report  
07 December, 2004 (07.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012330

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-512792 A (GENESENSE TECHNOLOGIES INC.), 08 May, 2002 (08.05.02), Full text; particularly, Claims; Par. No. [0005]; example 8 & WO 99/55854 A2 & EP 1073728 A2 & US 2002/187954 A1 & CA 2326825 A & BR 9909859 A	1-4
P,X	GOYA, Masato et al., Growth Inhibition of Human Prostate Cancer Cells in Human Adult Bone Implanted into Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Mice by a Ligand- Specific Antibody to Human Insulin-Like Growth Factors, Cancer Research, 2004, Vol. 64, No.17, pages 6252 to 6258	1-4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012330

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.5 of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DUNN, Sandra E. et al., A Dominant Negative Mutant of the Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibits the Adhesion, Invasion, and Metastasis of Breast Cancer, Cancer Research, 1998, Vol.58, No.15, p.3353-3361	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.11.2004

国際調査報告の発送日

07.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

4P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WANG, Yuli et al., Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis, Current Cancer Drug Targets, 2002, Vol.2, No.3, p.191-207	1-4
Y	JP 2002-512792 A (ジェネセンス テクノロジーズ インコーポレイテッド) 2002.05.08 全文、特に特許請求の範囲、段落【0005】、実施例8参照 &WO 99/55854 A2 &EP 1073728 A2 &US 2002/187954 A1 &CA 2326825 A &BR 9909859 A	1-4
PX	GOYA, Masato et al., Growth Inhibition of Human Prostate Cancer Cells in Human Adult Bone Implanted into Nonobese, Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Mice by a Ligand-Specific Antibody to Human Insulin-Like Growth Factors, Cancer Research, 2004, Vol.64, No.17, p.6252-6258	1-4

## 第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ ☒ 配列表  
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面  
☒ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる  
☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された  
☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**